

Aus dem Zentrum für Klinische Chemie, Immunologie
und Humangenetik
der Justus Liebig-Universität Gießen

Pankreasenzymdiagnostik in der Routine

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Horst Löckermann
aus Frankfurt am Main

Gießen 1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Zentrum für Klinische Chemie, Immunologie
und Humangenetik
der Justus Liebig-Universität Gießen

Pankreasenzymdiagnostik in der Routine

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Horst Löckermann
aus Frankfurt am Main

Gießen 1974

Dekan: Prof. Dr. D. Ringleb

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Róka

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Gundlach



<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>PROBLEMATIK</u>	9
3. <u>METHODIK</u>	
3.1. <u>Lipase</u>	
3.1.1. Methodenübersicht	10
3.1.2. Referenzmethode	11
3.1.3. modifizierte Methode	17
3.1.4. Schnellmethode	35
3.1.5. Einfluß des Hämoglobins auf die Lipaseaktivität	53
3.1.6. Einfluß des Heparins auf die Serum- lipaseaktivität in vivo und vitro	56
3.2. <u>Amylase</u>	
3.2.1. Methodenübersicht	60
3.2.2. Referenzmethode	63
3.2.3. Chromogenmethode	68
3.2.4. Jodometrische Methode	76
3.2.5. Schnellmethode	83
4. <u>Zuverlässigkeit und Qualitätskontrolle der angewandten Methoden</u>	
4.1. Herstellung des Kontrollserums	89
4.2. Präzision der Methoden in der Serie	
4.2.1. Lipase	89
4.2.2. Amylase	92
4.3. Qualitätskontrolle der Methoden von Tag zu Tag	92
5. <u>METHODENVERGLEICH</u>	
5.1. statistische Aussagen	98
5.2. methodischer Aufwand der einzelnen Tests unter besonderer Berücksichtigung im Routineeinsatz	108
6. <u>Haltbarkeit der Serum- und Urinproben</u>	111

7. <u>NORMALBEREICHE</u>	Seite
7.1. Normalkollektiv	113
7.2. Normalbereiche der Lipase- und Amylaseaktivität im Serum	115
7.2.1. Normalbereich der Serumlipaseaktivität	115
7.2.2. Normalbereich der Serumamylaseaktivität	120
7.3. Normalbereich der Urinamylaseaktivität	125
7.4. Korrelationen der Urinamylaseaktivität mit der Kreatinin- und Harnstoffkonzentration des Morgenurins	129
7.5. Korrelation der Amylase- und Lipaseaktivität im Serum gesunder Probanden	130
8. <u>Vereinfachung des Sekretininduzierten Provokationstests mit Messung der Serumlipaseaktivität</u>	130
9. <u>Diagnostische Aussagekraft der Lipase- und Amylaseakti- vitätsbestimmung im Serum und Urin bei Pankreopathien</u>	133
10. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	141
11. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	143
12. <u>TABELLEN</u>	
12.1. Varianzanalysen der Altersabhängigkeit	155
12.2. Varianzanalysen der Korrelationen	161

1. EINLEITUNG

Die Pankreasdiagnostik stellt in der inneren Medizin auch heute noch ein schwieriges diagnostisches Problem dar. Durch verbesserte Diagnostizierbarkeit wird man insbesondere auf Begleitpankreatitiden bei den verschiedensten internen Erkrankungen aufmerksam, wobei besonders die Cholangiopathien erwähnt werden sollen (26,47,54).

Eine frühzeitige Erkennung einer Pankreopathie ist für eine erfolgreiche Therapie von entscheidender Bedeutung (31,54). Besonders dann, wenn man annimmt, daß die chronische Pankreatitis mit ihrer Gewebsunruhe als eine Präkancerose anzusehen ist (48,49).

Die klinische Symptomatologie einer Pankreaserkrankung ist häufig nicht eindeutig und schließt andere Differenzialdiagnosen im Rahmen eines akuten Abdomens nicht aus. So wird eine Operation bei einer Magenperforation lebensrettend, bei einer akuten Pankreatitis aber meist kontraindiziert sein.

Hier wird auch der erfahrene Untersucher die Labordiagnostik zur Bestätigung seiner Diagnose in Anspruch nehmen.

Zur Pankreasdiagnostik stehen heute folgende Untersuchungsverfahren zur Verfügung:

1. die Analyse exkretorischer Pankreasenzyme in verschiedenen Körperflüssigkeiten
2. die Pankreasszintigraphie (41)
3. die Coeliacographie (95)
4. die duodenoskopische Pankreaticocholeodochographie (58)
5. die fraktionierte Duodenalsaftuntersuchung

Diese radiologischen Untersuchungsverfahren und die Duodenalsondierung sind in Praxi zu aufwendig und daher Spezialklinien vorbehalten. In der Praxis ist man folglich auf die Untersuchung des Blutes und Harns angewiesen. Besonders bei Screeninguntersuchungen und in der Vorfelddiagnostik benötigt man einfach durchzuführende Untersuchungen mit ausreichender Treffsicherheit.

Um die exkretorische Leistung des Pankreas abzuschätzen, wird heute allgemein als zuverlässigste Methode die Gewinnung des

Duodenalsafts mit der dreiläufigen Doppelballonsonde unter Röntgenkontrolle nach hormonaler Provokation anerkannt (14). Mit dieser aufwendigen Untersuchungstechnik lassen sich schon frühzeitig diskrete, pankreatogenbedingte Verdauungsinsuffizienzen objektivieren. Stuhluntersuchungen auf Ausnutzung oder Fettsäureausscheidung fallen trotz bestehender Pankreasinsuffizienz häufig normal aus (1,66).

Von den verschiedenen vom exkretorischen Pankreas sezernierten Enzymen haben zwei eine größere Bedeutung in der Pankreasdiagnostik erlangt; das sind die 1664 entdeckte Amylase und die 1856 erstmals entdeckte Pankreaslipase.

Die Proteasen werden im Plasma durch Inhibitoren inaktiviert, so daß deren Nachweis im Serum erschwert ist.

Die α -Amylase (EC 3.2.1.1.) hydrolysiert nichtterminale α -1,4 Glukosidbindungen hauptsächlich zu Maltose (70-90 %), kleinen Mengen Glukose und α -Grenzdextrinen.

Die Pankreaslipase (EC 3.1.1.3.) spaltet Glycerinester langkettiger Fettsäuren nur an der Ester-Wasser-Grenzschicht zu Glycerin und freien Fettsäuren über Di- und Monoglyceride.

Beide Enzyme werden im Gegensatz zu den meisten Proteasen in aktiver Form sezerniert.

Die Bestimmung der Amylase- und wahrscheinlich auch die der Lipaseaktivität im Serum erfaßt die Summe der jeweiligen Isoenzyme dieser Fermente.

Im Serum und Harn wurden zwei Isoenzyme der Amylase aus zwei Organen (Pankreas und Speicheldrüsen) durch Agargel-Elektrophorese getrennt. Die relativen Aktivitäten dieser beiden Isoenzyme sind im Harn unterschiedlich (53). RAJASINGHAM et al. fanden mit der Agargel-Elektrophorese abweichend von KAMARYT nur eine pankreatogene Amylase im Serum. Mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese erhalten sie im Serum zwei Isoamylasen aus dem Pankreas und keine aus dem Speichel; im Urin ebenfalls nur eine Isoamylasenbande, die sich mit einer aus dem Pankreas deckt. So nehmen sie an, daß die Serumamylase nur aus dem Pankreas stammt (56). Die α -Amylasen wandern in der Elektrophorese zwischen den β - und den γ -Globulinen (53).

Aus dem Pankreassekret konnten drei verschiedene Komponenten

mit lipolytischer Aktivität auf Olivenölemulsion durch Gel-filtration gewonnen werden. Es ist noch nicht entschieden, ob die einzelnen Komponenten Isoenzyme oder nur monomere und polymere Formen des gleichen Enzyms sind. Die Komponente mit dem höchsten Molekulargewicht glich im Aktivierungsverhalten durch Gallensalze der Leukozytenlipase (55).

Amylase kann mit Globulin Molekülaggregate bilden (Makroamylasämie), die nicht nierengängig sind und eine erhöhte Serumamylase bei normaler Urinamylase vortäuschen (5,57,61).

Im Serum von Gesunden mißt man individuelle aber weitgehend konstante α -Amylase- und Lipaseaktivitätsspiegel (54). Bei Pankreopathien können diese Enzymaktivitäten im Serum ansteigen; hierfür prägte KATSCHE 1924 den Begriff der "Fermententgleisung".

Wie werden diese beiden Enzymaktivitätsspiegel beim Gesunden aufrechterhalten?

Die normalerweise im Serum nachweisbare Amylase ist zum Teil extrapankreatischen Ursprungs, da nach Pankreatektomie der Serumamylasespiegel nur wenig oder nicht abfällt; das gleiche Verhalten kann man auch bei der Lipase beobachten (16,17). So ist anzunehmen, daß ebenfalls ein Teil der Serumlipase nicht aus dem Pankreas stammt. Als eine extrapankreatische Lipase käme vielleicht die schon erwähnte Leukozytenlipase oder die normalerweise im Blut nur in geringer Aktivität nachweisbare Lipoproteinlipase in Betracht.

Auf der anderen Seite könnte einmal ein Pankreas aberrans für diese fortbestehenden Enzymspiegel nach Pankreatektomie verantwortlich sein.

Zur Interpretation der "normalen" Blutspiegel exkretorischer Pankreasenzyme wird bei einer physiologischen Sekretion der Parenchymzelle in das Lumen eine Begleitsekretion in den extrazellulären Raum angenommen (54). Bei einer physiologischen "Leck" der Zellmembran sollte man nach Stimulierung mit Pankreozymin einen hohen Enzymgehalt im Perizellularraum erwarten. Die Enzymaktivitätsblutspiegel nach einem solchen "Leck" müßten jedoch bei einem Pankreasgesunden nicht

zu (12,17,65). Als Herkunft des physiologischen Pankreasenzymblutspiegels könnte man die Zellmauserung des Pankreasparenchyms zur Diskussion stellen, während eine Rückresorption enzymatisch aktiver Enzyme aus dem Darmlumen sehr unwahrscheinlich sein dürfte.

Dagegen lassen sich zum Pathomechanismus der Pankreasenzymbhutspiegelerhöhungen bei Pankreopathien leichter Modellvorstellungen entwickeln.

Die exkretorischen Enzyme treten aus der geschädigten Parenchymzelle über einen Zellpermeabilitätsdefekt in den Interzellularraum und weiter via Lymphgefäße ins Blut über. Doch können die Enzyme nur laufend ins Blut gelangen, wenn sie noch weiter von enzymsynthetisierenden Pankreaszellen gebildet werden. Bei totaler, nekrotisierender Pankreatitis ist daher nach einem initialen Enzymschub ins Blut ein Sturz in den Normalbereich zu beobachten.

Enzymübertritt in den Interzellularspalt wäre denkbar:

1. bei einem interzellularen, entzündlichen Ödem mit mechanischem Druck auf die Zelle von außen und dadurch ausgelöster Schädigung der Zellmembran;
2. bei einer Stauung im abführenden Pankreasgangsystem und damit verbundener Druckerhöhung mit nachfolgender retrograder "Sekretion" von exkretorischen Enzymen, wobei die Acinuszellen eine längerdauernde Stauung durch Zellatrophie beantworten.

Die retrograde Enzymsekretion läßt sich bei allen Pankreopathien mit Obstruktion, wie: Pankreastumoren, Ductussteine, Papillensteine oder chronische Pankreatitis mit Verödung des Gangsystems, durch Stimulation der Enzymsekretion besser erkennen.

Maximale Stimulation erreicht man durch Injektion von Pankreozymin und/oder Sekretin. Beide Hormone werden in der Duodenalmukosa gebildet und durch den sauren Magensaft, Eiweißspaltprodukte und Fette freigesetzt. Bei diesem Provokationstest fördert Pankreozymin unter anderem die Entleerung der Zymogengranula in das Acinusalumen (59), während Sekretin über eine Wasser- und Bikarbonatsekretionserhöhung des Ductusepi-

thels einen Ausschwenneffekt schon gebildeten Pankreasenzym zeigt. Bei fortgeschrittenen chronischen Pankreatitiden ist daher nach Stimulierung mit Sekretin ein stärkerer Anstieg der Enzymblutspiegel zu erwarten als nach Pankreozymin, weil sich im stenosierten Gangsystem exkretorische Enzyme ansammeln, aber auf Grund der rarifizierten Acinuszellen nur langsam nachbilden.

Erst wenn mehr als 50 % des Pankreasparenchyms sekretorisch inaktiv wurde (54) bzw. der Lipase- oder Trypsinoutput auf weniger als 10 % der bei gesunden Probanden ermittelten Normalwerte absinken (98), kann man eine Pankreasinsuffizienz am pathologischen Ausfall eines Pankreozymin-Sekretin-Tests mit Duodenalsondierung beobachten. In einem fortgeschrittenen Stadium der Pankreasinsuffizienz wird man mit einem positiven Ausfall des Provokationstests im Serum nicht immer rechnen können, sondern nunmehr versuchen, eine verminderte Enzymausscheidung in das Duodenum aufzuzeigen. Dies kann man bei höhergradiger Pankreasinsuffizienz leicht und zuverlässig durch den verminderten Enzymgehalt im Stuhl erreichen. Dabei hat sich als Indikator der globalen Exkretionseinschränkung die Abnahme des Chymotrypsins im Stuhl erwiesen (51,54).

Die Objektivierung einer Fermententgleisung oder eines pathologischen Evokationstests besteht in einer reinen Funktionsdiagnostik und sagt nichts über das morphologische Substrat aus, das hinter diesen Veränderungen steht. Daher ist eine effektivere Pankreasdiagnostik im wesentlichen abhängig von der Entwicklung geeigneter Routinemethoden zur Erfassung der morphologischen Veränderungen des Pankreas. Am besten wird man den erreichten Schädigungsgrad des Organs abschätzen können, wenn man die histologische Diagnose zusammen mit der Funktionsanalyse beurteilt.

Der diagnostische Wert des Provokationstests mit anschließender Enzymbestimmung im Serum wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt. Einige Autoren halten ihn für gering (25,52), die meisten betrachten ihn als ein wichtiges diagnostisches Kriterium zur Aufdeckung einer subakuten, mit Gangobstruktionen einhergehenden Pankreaserkrankung (1,11,12,16,17,64,65,66,96).

Es ist zu beachten, daß nur ein positiver Evokationstest diagnostisch gewertet werden darf, da bei fortgeschrittener Pankreasinsuffizienz zu wenig Parenchym für eine signifikante Erhöhung der Enzymproduktion zur Verfügung steht.

Folgende ätiologische Faktoren einer Pankreatitis stehen zur Diskussion:

1. die nach Gangobstruktionen einsetzende Autodigestion des Pankreas durch intraduktuläre Aktivierung zu Trypsin, Phospholipase A und Elastase bis zur hämorrhagischen Totalnekrose (48);
2. eine Störung der Zellhomöostase durch Schädigung des Zellenergiestoffwechsels auf Grund einer Hypoxie oder direkter toxischer Schädigung der Parenchymzelle, die die Zellwand für die Enzyme permeabel werden läßt.
Gerade bei der alkoholischen Pankreatitis wird als auslösender Faktor die direkte toxische Schädigung der Parenchymzelle durch Alkohol für möglich gehalten.
3. Bei Kapillarschäden im Sinne eines Arthus-Phänomens kann durch Gefäßthromben eine hämorrhagische (60) und vielleicht auch die allergische Pankreatitis zustande kommen.
4. Untersuchungen deuten darauf hin, daß auch bei der chronischen und akuten Pankreatitis Autoimmunprozesse primär oder sekundär beteiligt sein werden. Bei diesen Pankreaserkrankungen wurde die Sensibilisierung von Lymphozyten gegen Pankreasantigene und gegen Pankreasgewebe gerichtete freie Antikörper in etwa 60 % der Fälle bestimmt (89).

Der Aktivitätsgrad eines Enzyms im Blut hängt ab von seiner Bildungs-, Abbau- und Eliminationsrate und seiner möglichen partiellen oder totalen Inhibierung im Serum. Ein typisches Beispiel ist das Trypsin, dessen Bestimmung dadurch sehr erschwert wird.

Die α -Amylase wird vermutlich teilweise im RES abgebaut (61) und über die Niere durch glomeruläre Filtration ausgeschieden, wobei die Clearance rate bei Normalpersonen mit 3 - 4 ml/min recht konstant ist (18) und etwa 3 % der Kreatininclearance (62) beträgt oder nach (61) bei 1 - 3 ml/min liegen soll.

Die Amylaseclearance soll bei normaler Nierenfunktion weder von der Diureserate (12), noch von der Höhe des Serumamylasespiegels abhängig sein (62).

Konträr zu diesen Befunden fanden DELCOURT (18) und MULHAUSEN (68) eine beachtliche Erhöhung der Amylaseclearance bei Pankreatitispatienten, wobei der Amylasespiegel im Blut durchaus normal sein konnte. Diese Clearanceerhöhung könnte den postulierten Anreicherungsseffekt der Amylase im Harn erklären.

Ferner ist es bei Pankreaserkrankungen diagnostisch von Bedeutung, daß die Amylase wie auch die Lipase im Aszites (67) oder Pleuraerguß häufig in hohen Aktivitäten nachgewiesen werden kann. Ein unspezifischer Serumamylaseanstieg im Rahmen einer Niereninsuffizienz ist schon lange bekannt. Das gleiche Verhalten wird auch von der Lipase für möglich gehalten (12,24,63), obwohl viele Untersucher eine Ausscheidung der Lipase über die Niere ausschließen (7,11,12,66). So bleibt die Frage nach dem Abbau- oder Ausscheidungsvorgang der Lipase noch offen. Die halbe Verweildauer der Lipase beträgt im Plasma nach RICK (7) etwa 16 Stunden.

In der Literatur wird der Wert der Lipase- und Amylasebestimmung im Serum und Harn für die Pankreasdiagnostik sehr unterschiedlich beurteilt. Die Lipase wird überwiegend als ein besonders pankreasspezifisches Enzym, diagnostisch wertvoller als die Amylaseaktivitätsbestimmung eingestuft (13, 15,17,23,39). Doch bleibt dieser Grundtenor, den man besonders in den neusten Arbeiten findet, nicht unwidersprochen; denn andere Autoren halten die gleichzeitige Bestimmung der Amylase und Lipase für erforderlich, um eine Pankreasaffektion sicher ausschließen zu können (24,25,40,65).

Außerdem diskutiert man noch die diagnostische Notwendigkeit, die Amylase routinemäßig entweder im Serum oder im Urin, oder sogar in beiden Körperflüssigkeiten nachzuweisen. Zum Ausschluß einer Pankreaserkrankung oder zur Therapieverlaufskontrolle scheint die Majorität die alleinige Messung der Urinamylaseausscheidung für ausreichend zu halten (16,12,54).

LORENTZ (2) fand ein diagnostisch gleichwertiges Verhalten der Amylaseaktivität im Serum und Urin. Einige Untersucher halten eine Amylasebestimmung im Serum und Urin für notwen-

dig, um beispielsweise einen falschpositiven Serumamylasetest im Rahmen einer Makroamylasämie zu entlarven (2,18,54).

Ein organspezifisches Pankreasleitenzym des Intermediärstoffwechsels steht der Diagnostik noch nicht zur Verfügung (25).

Auch das membranständige Enzym Aminosäurearylamidase und besonders dessen Isoenzym 2 (42) läßt neueren Befunden (87, 90) zufolge keine spezifischen Aussagen über eine Pankreaserkrankung zu. Eine Erhöhung der Transaminasen, der AP oder anderer Intermediärenzyme zeigen bei einer Pankreaserkrankung nur eine Mitbeteiligung der Leber oder des Gallengangsystems an (25).

So basiert die Suche nach einer Pankreopathie auch heute noch auf der Diagnostik der exkretorischen Pankreasenzyme. Hierbei mußte man sich in der Praxis lange auf die Bestimmung der Amylase im Serum oder Harn beschränken, da methodische Gründe den Einzug der vielversprechenden Lipaseaktivitätsmessung in die Routine und damit auch in die Vorfelddiagnostik des niedergelassenen Arztes erschwert haben.

2. PROBLEMATIK

In dieser Arbeit werden drei Methoden zur Lipasebestimmung im Serum und vier Tests zur Amylaseaktivitätsmessung im Serum und Harn vergleichend untersucht; hierbei wird nicht nur die diagnostische Aussagekraft, sondern auch die praktische Durchführbarkeit der Methode besonders berücksichtigt.

In diesem Zusammenhang soll der Treffsicherheit eines Lipase- und Amylaseschnelltests für die Routinediagnostik besondere Beachtung geschenkt werden. Außerdem wird der Wert der Lipase- und Amylasebestimmung in der Pankreasdiagnostik durch Beobachtung von Krankheitsverläufen geprüft.

Zusätzlich wurden noch folgende Programmpunkte aufgestellt:

1. Bestimmung der Normalbereiche beider Enzyme für die erwähnten Methoden;
2. prüfen, ob man nach Provokation mit Sekretin die Lipasebestimmung im Serum ohne wesentlichen Verlust an diagnostischer Sicherheit zeitlich abkürzen darf;
3. prüfen, wie weit Hämoglobin die Lipaseaktivität stört;
4. prüfen, welchen Einfluß eine Heparininjektion auf die Lipaseaktivität im Postheparinplasma hat.

3. METHODIK

3.1. Lipase

3.1.1. METHODENÜBERSICHT

Die Lipase katalysiert bevorzugt die Hydrolyse des Olivenöls und des Trioieins, so daß die beiden Substrate als einigermaßen lipasespezifisch anzusehen sind. Sie muß als wasserlösliches Enzym durch Emulgierung des wasserunlöslichen Substrats mit diesem in Kontakt gebracht werden. Diese Substrate werden in Glycerin und freie Fettsäuren hydrolysiert, die oberhalb von pH 8,0 zu 99 % dissoziiert sind (7).

Die verschiedenen Testverfahren zur Lipaseaktivitätsbestimmung können in zwei Gruppen zusammengefaßt werden:

1. Abnahme des Substrats

1.1. Photometrische Messung der Trübungsabnahme einer alkoholischen Olivenölemulsion (72)

2. Zunahme der Produkte

2.1. Titration der freiwerdenden Protonen (8,7)

2.2. Photometrische Messung der abgespaltenen Fettsäuren die zu Kupferseifen gebunden werden (10,46,88)

2.3. Bestimmung des Glycerins

Nephelometrische Tests können nicht die optimalen Meß- und Reaktionsbedingungen erfüllen, die man an einen Enzymtest stellt.

Photometrische Nachweisverfahren setzen voraus, daß man die Fettsäuren von der undurchsichtigen Olivenölemulsion abtrennt, um ein klares Medium zu erhalten.

Die Bestimmung der Glycerinzunahme wird nicht nur auf Grund der gleichen Schwierigkeiten wie bei der Fettsäureanalyse erschwert, sondern vielmehr stört der Abbaumodus der Triglyceride, der stufenweise über Di- und Monoglyceride zu freiem Glycerin erfolgt.

Da diese methodischen Schwierigkeiten in der Routine hinderlich sind, habe ich mich um die Verbesserung der titrimetrischen Lipaseaktivitätsbestimmung bemüht.

3.1.2. REFERENZMETHODE

Als Referenzmethode wurde die Messung der Lipaseaktivität im Serum nach RICK (7) gewählt: Die aus dem Substrat Olivenöl freigesetzten Fettsäuren werden bei pH 8,6 kontinuierlich mit 0,01 n NaOH titriert. Der Verbrauch an NaOH in der Zeiteinheit entspricht der Enzymaktivität.

Meßanordnung:

Titratortyp TTT 1c mit Glas- und Kalomelelektrode, Autobürette ABU 1 mit Titrervolumen von 0,25 ml und einzelnen Titrationschritten von etwa 0,1 μ l, Titrigraph SBR 2.

Sämtliche Geräte einschließlich dem Magnetrührer und dem Reaktionsgefäß müssen zentral geerdet werden.

Lösungen:

0,01 N NaOH

Die 0,01 N NaOH wird mit Kohlendioxid-freiem bidest. Wasser angesetzt. Die in das Vorratsgefäß der Autobürette nachströmende Raumluft läßt man durch 20 %ige NaOH perlen, um sie vom Kohlendioxid zu befreien. Sie ist etwa 6 Monate haltbar.

Zur Ermittlung des genauen Titors der NaOH wurde die Titrationskurve von 20 μ l einer 0,1 N Oxalsäure registriert.

Olivenölemulsion

Das Substrat wird aus 4 Teilen 10 %iger Gummi arabicum-Lösung und 1 Teil reinem Olivenöl im Starmix homogenisiert. Um einen Leerwert ohne NaOH-Verbrauch zu erhalten, ist es notwendig, die in den emulgierten Öltröpfchen enthaltenen freien Fettsäuren zu neutralisieren. Dies erreicht man durch kurzzeitiges Alkalisieren des Emulgats auf pH 11, bevor man das Substrat auf etwa pH 8,7 einstellt. Sie ist, bei 4°C aufbewahrt, wenigstens 1 Woche haltbar.

Als Aktivator der Lipase wird 75 mM Na-Glykokochlatlösung benutzt.

Die Meßtemperatur der kinetischen Enzymmessung beträgt 25°C und wird durch einen Wasserthermostaten konstant gehalten. Während der Messung der Lipaseaktivität muß ein Stickstoff-

strom über den Testansatz geleitet werden, um eine CO_2 -Absorption zu verhindern.

Enkonzentrationen im Test: Endvolumen (EV) = 15 ml

0,133 ml Olivenöl/ml EV

53,3 mg Gummi arabicum/ml EV

1,5 mMole Na-Glykocholat = 0,75 mg/ml EV

Testansatz:

Ins Reaktionsgefäß werden 10 ml Olivenölemulsion, 3,7 ml bi-dist. Wasser, 0,3 ml Na-Glykocholatlösung und 1,0 ml hämolyse-freies Serum gegeben.

Der Ansatz wird zunächst mit 0,1 N NaOH oder 0,1 N HCl auf ein pH etwas oberhalb 8,6 eingestellt.

Der Verbrauch an 0,01 N NaOH muß mindestens 5-10 Minuten lang aufgezeichnet werden, wobei sich eine Gerade ohne Stufen oder Wellen ergeben soll. Treten diese erwähnten Kurvenbildveränderungen auf, ist mit Elektrodenfehlern und somit mit Fehlmessungen zu rechnen. Außerdem sollte vor jeder Meßreihe der Leerwert kontrolliert werden; denn ein Verbrauch an Natronlauge, ohne daß ein Enzym in den Ansatz gegeben wurde, weist auf verdorbenes Substrat oder defekte Elektroden hin. Da die Elektrodenmembranen durch die Olivenölemulsion leicht vergiftet werden, müssen sie nach jeder Messung mit einer Äther-Alkohol-Mischung im Verhältnis 1:1 gesäubert werden.

Berechnung der Lipaseaktivität:

Die Enzymaktivität in U/l ergibt sich aus dem Verbrauch an 0,01 N NaOH pro Minute:

$$10 \text{ } \mu\text{l } 0,01 \text{ N NaOH/min} \hat{=} 100 \text{ U/l}$$

1. Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Enzymmenge:

Die Probenmenge von 1 ml Serum ist zu groß, wenn bei einem Patienten noch weitere klinische chemische Untersuchungen durchgeführt werden oder bei Kleinkindern.

Abb. 1 veranschaulicht die lineare Beziehung der Lipaseaktivität zur zugeführten Enzymmenge in diesem Test. Es wurden zwei Seren in Doppelbestimmungen mit verschiedenen hohen Lipaseakti-

vitäten untersucht. Die Methode erfaßt 50 mU/Ansatz noch mit ausreichender Genauigkeit und verläuft bis zu 1000 mU/Ansatz linear. Daher wurden zur Enzymbestimmung bei Kindern unter 14 Jahren 200 μ l sonst 500 μ l verwandt und entsprechend 800 oder 500 μ l bidest. Wasser mehr zum Ansatz pipettiert.

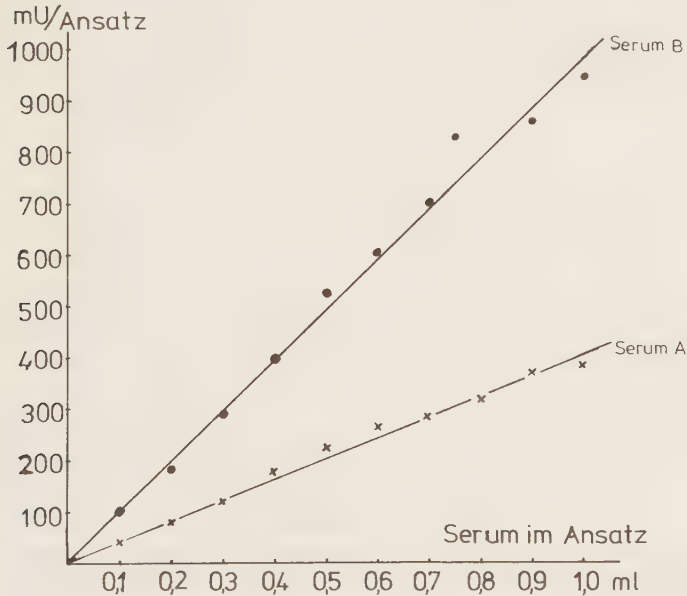


Abb. 1

Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom Serumvolumen im Ansatz
Serum A 409 U/l, Serum B 995 U/l

2. Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom pH:

Viele Autoren (8,10,70) geben das pH-Optimum der Lipase mit pH 8,0 an. RICK (7) fand die höchste Lipaseaktivität bei pH 8,7. Durch die Messung zweier Pankreatitisseren konnte ich ebenfalls die maximale Lipaseaktivität bei beiden Seren bei pH 8,7 objektivieren (Abb. 2). Ab pH 7,0 war keine Lipaseaktivität mehr messbar. Die Spontanhydrolyse des Olivenöls

setzt bei 25°C oberhalb von pH 8,9 ein.

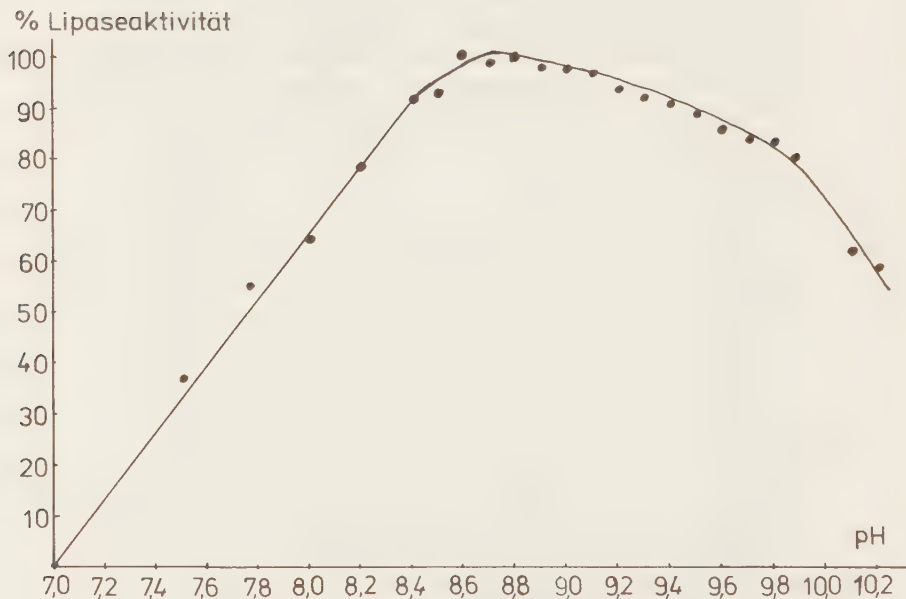


Abb. 2

Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom pH des Ansatzes abzüglich der Spontanhydrolyse; Mittelwerte zweier Seren (1365 und 2000 U/l)

3. Lipaseaktivitätsbestimmung verschiedener Seren in einem Ansatz:

Da man pro Arbeitsplatz mit dieser Methode etwa jede halbe Stunde (16,86) und nach meinen Erfahrungen höchstens 25 Tests pro Arbeitstag durchführen kann, habe ich versucht, diese Methode zeitlich abzukürzen.

Eine Zeitersparnis ist dadurch zu erreichen, daß man mehrere Seren hintereinander in einem Ansatz pipettiert und damit die zeitraubenden Einstellarbeiten der Versuchsanordnung auf den Start-pH der enzymatischen Reaktion abkürzt. Die Einzelaktivitäten der Seren werden jeweils aus der Differenz der

zuvor gemessenen Gesamtaktivität des Ansatzes und der zuzüglich dieses Serums gemessenen Gesamtlipaseaktivität berechnet.

Hierbei erwartet man, daß die Messung der Gesamtaktivität mehrerer Seren sich als Summe der Einzelaktivitäten dieser Seren ergibt.

Ob diese Prämisse erfüllt wird, wurde mit fünf Seren untersucht, deren Einzelaktivitäten bekannt waren. Je zwei bis fünf dieser Seren wurden in verschiedenen Kombinationen in jeweils einen Ansatz hinzugegeben und zwar 500 μ l von Serum 1 und 2 und 200 μ l von Serum 3, 4 und 5.

Ergebnis:

Sind mehr als drei Seren in einem Ansatz, so weicht die gefundene Enzymaktivität erheblich (bis zu 40 %) von der errechneten Gesamtaktivität ab. In 14 Tests wurden je Ansatz zwei oder drei Seren gemessen (Tab. 1).

Sechsmal streute der gemessene Wert im Bereich von ± 4 % vom erwarteten Wert, aber häufiger in weit höheren Grenzen (+ 21 bis - 16 %). Dieses Ergebnis zeigt, daß es nicht möglich ist mehr als ein Serum pro Ansatz zu bestimmen, da die Abweichungen der gemessenen Enzymaktivitäten von den erwarteten Lipaseaktivitäten meistens zu groß ausfallen.

Diese Meßabweichungen können einmal durch den unterschiedlichen Eiweißgehalt der Serumproben bedingt sein, obwohl sich durch Zugabe einer 5 %igen Albuminlösung oder eines wenig aktiven Serums zu einer Serumprobe im Ansatz die ohne Zusätze gemessene Lipaseaktivität nicht wesentlich ändert.

Zum anderen könnte auch ein unterschiedlicher Gehalt von Lipaseinhibitoren in den Seren für diese unerwarteten Testergebnisse verantwortlich sein.

Tab. 1

Messung der Gesamtlipaseaktivität von fünf Seren in einem Ansatz, wobei je Ansatz zwei oder drei Seren hinzugegeben wurden.

Serum	Gesamtlipaseaktivität errechnet	gemessen	Abweichung der gemessenen von d. berechneten Gesamt- lipaseaktivität in %
1 + 2	163 U/l	143 U/l	- 12 %
1 + 3	173	155	- 10
1 + 4	354	390	+ 10
1 + 5	390	470	+ 21
2 + 3	135	130	- 4
2 + 4	317	316	0
2 + 5	352	330	- 7
3 + 4	326	275	- 16
3 + 5	362	360	0
4 + 5	544	555	+ 2
1 + 2 + 3	236	213	- 10
2 + 4 + 5	607	630	+ 4
3 + 4 + 5	616	600	- 3
1 + 2 + 5	453	530	+ 21

Serum 1 = 201 U/l

Serum 2 = 126

Serum 3 = 362

Serum 4 = 1270

Serum 5 = 1445

3.1.3. Verbesserung der weitverbreiteten Methode von WEBER

Die Methode nach WEBER (8) beziehungsweise nach TIETZ et al. (70) mißt die in einer gepufferten Olivenölemulsion durch die Lipase freigesetzten Fettsäuren titrimetrisch mit NaOH. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen ist es gelungen, eine beträchtliche Enzymaktivitätszunahme gegenüber der Methode nach WEBER zu erreichen, selbst bei Herabsetzung der Reaktionstemperatur von 37 auf 25°C entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (71).

Meßanordnung:

Benötigt werden ein auf 25°C temperiertes Wasserbad mit der Möglichkeit zur Gegenkühlung bei erhöhter Umgebungstemperatur; Magnetrührwerk mit 1-2 cm langen Magnetstäbchen; automatische Bürette (z.B. Autobürette ABU 1 mit Titriervolumen von 25 ml) oder handelsübliche Schnellbüretten mit Schellbachstreifen und einer Ablesegenauigkeit von 0,01 ml; Zentrifugenröhrchen 92 x 24 mm; automatische 5 ml Pipette.

Reagenzien:

Gummi arabisch, fein gepulvert (Merck 4282)
Oleum olivae neutralisat., sterilisat. (Siegfried)
Glykocholsäure purum (Fluka 50540)
oder
Na-Glykocholat (Roth 2-7584)
Tris-Puffersubstanz p.a. (Merck 8382)
Thymolphthalein (Merck 8175)
Äthanol 96 %
Natrium benzoicum gepulvert (Merck 6290)
1 N Natronlauge
0,1 N Natronlauge
1 N Salzsäure
0,1 N Salzsäure

Lösungen:

Olivenölemulsion 50 % (v/v)

Im Starnix (Stufe 1) werden 1,0 g Natrium benzoicum und 37 g Gummi arabicum in 400 ml Aqua bidest. gelöst (etwa 10 min).

Anschließend gießt man langsam 500 ml Olivenöl hinzu und homogenisiert diese Emulsion zuerst 5 min auf Stufe 1 und dann weitere 5 min auf Stufe 2. Die Emulsion ist bei 4°C aufzuwahren und vor Gebrauch etwas zu schütteln. Sie ist mindestens zwei Monate haltbar.

Tris-Puffer 100 mM, pH=8,6 (bei 25°C)

12,1 g Tris-Puffersubstanz in etwa 900 ml Aqua bidest. lösen und mit 1 N HCl auf etwa pH 8,8 einstellen. Diesen Pufferansatz ungefähr 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen lassen. Anschließend wird der Puffer bei 25°C mit 1 N HCl auf pH 8,6 eingestellt und auf 1000 ml Aqua bidest. aufgefüllt. Die Pufferlösung ist bei Zimmertemperatur mindestens ein Jahr haltbar.

Na-Glykocholatlösung 70 mM

In einem Becherglas über einem Magnetrührer 1,67 g Glykocholsäure in 3,6 ml 1 N NaOH und etwa 35 ml Aqua bidest. lösen. Nach vollständiger Lösung pH-Wert mit 0,1 N HCl (etwa 0,6 ml) über einem schnellaufenden Magnetrührer auf etwa pH 8,6 einstellen. Inhalt des Becherglases quantitativ mit Aqua bidest. in einen 50 ml-Meßkolben überführen und mit Aqua bidest. bis zur Marke auffüllen. Bei 0 bis 4°C aufbewahrt einige Monate haltbar.

oder

In einem Becherglas über einem Magnetrührer 1,83 g Na-Glykocholat in etwa 40 ml Aqua bidest. lösen. Nach vollständiger Lösung pH-Wert mit 0,1 N HCl (etwa 0,05 ml) über einem schnellaufenden Magnetrührer auf pH 8,6 einstellen. Inhalt des Becherglases quantitativ mit Aqua bidest. in einen 50 ml Meßkolben überführen und mit Aqua bidest. bis zur Marke auffüllen. Bei 0 bis 4°C aufbewahrt einige Monate haltbar.

Puffer-Substrat-Lösung

Kurz vor Gebrauch gibt man zu 1 Teil Olivenölemulsion (z.B. 100 ml), 1 Teil Tris-Puffer (z.B. 100 ml). Dieses Puffer-Substrat-Gemisch wird pro 10 ml mit 0,1 ml Na-Glykocholat-Lösung 70 mM (z.B. 2,0 ml) versetzt und einige Minuten über einem Magnetrührer gemischt.

Thymolphthalein-Stammlösung 2 % (w/v)

5 g Thymolphthalein mit 96 %igem Äthanol auf 250 ml auflösen.
Mindestens ein Jahr haltbar.

Thymolphthalein-Gebrauchslösung 0,16 % (w/v)

40 ml Thymolphthalein-Stammlösung mit 96 %igem Äthanol auf
500 ml auffüllen. Mindestens ein Jahr haltbar.

Natronlauge 0,025 N

Genau 25 ml 1 N NaOH im 1000 ml-Meßkolben mit Aqua bidest.
auf 1000 ml auffüllen. Die Natronlauge ist gut verschlossen
nur beschränkt haltbar.

Die zum Titrierlaugenvorratsgefäß nachströmende Luft ist zur
CO₂-Auswaschung entweder über Natronkalk oder durch 20 %ige
NaOH zu leiten.

Endkonzentrationen im Test:

EV = 5,2 ml

0,244 ml Olivenöl/ml EV

17,8 mg Gummi arabicum/ml EV

0,48 mg Natriumbenzoat/ml EV

50 mM Tris-Puffer pH=8,6 (bei 25°C)

0,68 mM Glykocholsäure = 0,34 mg/ml EV

3,2 mg Thymolphthalein im Ansatz

2 ml 96 %iges Äthanol im Ansatz

Testansatz:

In den Test darf nur hämolysefreies Serum eingesetzt werden.
Das Serum kann bis 7 Tage bei Zimmertemperatur ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

In Reaktionsgefäße pipettieren:		
	Leerwert	Probe
Serum	-	0,2 ml
Puffer-Substrat-Lösung	5,0 ml	5,0 ml
gut schütteln, genau 2 Stunden bei 25°C im Wasserbad inkubieren		
Thymolphthalein-Gebrauchslsg.	2,0 ml	2,0 ml
Serum	0,2 ml	-
gut mischen, in jedes Reaktionsgefäß einen Magnetstab geben und innerhalb 1 Stunde über dem Magnetrührer mit 0,025 N NaOH auf deutlich hellblau titrieren.		

Leerwert zuerst und die dazugehörige Probe unmittelbar darauf titrieren, wobei die Färbung des Leerwerts den Endpunkt der Titration anzeigt. Dazu wird der Leerwert direkt neben die zu titrierende Probe gehalten und die Farbgleichheit durch Aufsicht auf den Flüssigkeitsspiegel beurteilt.

Der Titer der 0,025 N NaOH sollte häufig geprüft werden. Hierzu gibt man in ein Becherglas genau (Enzympipette) 0,5 ml 0,1 N HCl und 0,5 ml Thymolphthalein-Gebrauchslösung und titriert, bis der Indikator nach dunkelblau umschlägt. Diese Messung wird dreimal wiederholt und der Mittelwert dieser Messungen in folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{2,00}{\text{ml verbrauchte NaOH}} = K$$

Berechnung der Lipaseaktivität:

Die internationale Einheit der Lipaseaktivität wird in Mikromolen freigesetzter Fettsäuren pro Minute unter standardisierten Bedingungen bei 25°C ausgedrückt (22). Die Lipaseaktivität in U/l ist dem Natronlaugenverbrauch direkt proportional. Den Natronlaugenverbrauch in ml erhält man aus der Differenz des Probenwerts vom Leerwert.

$$\begin{aligned}\text{Lipaseaktivität in U/l} &= (A-L) \times \frac{5000 \times 25}{120} \times K \\ &= (A-L) \times 1042 \times K\end{aligned}$$

Der Faktor leitet sich wie folgt ab:

Da sich die internationale Einheit auf 1000 ml Serum bezieht, muß die eingesetzte Serummenge mit 5000 multipliziert werden. 1 ml NaOH enthält 25 yMol NaOH. Reduktion der Inkubationszeit von 120 min auf 1 min.

Besondere Hinweise:

Der Leerwert liegt etwa in der Größenordnung von 2,6 - 2,9 ml.

Da die Leerwerte von Serum zu Serum in einer Serie nur gering schwanken, ist es möglich, bei einem Provokationstest alle Proben des gleichen Patienten gegen einen Leerwert seines Serums zu titrieren.

Die Pipettierung der Puffer-Substrat-Lösung muß sehr sorgfältig erfolgen, so daß im Leerwert- und im Probenansatz die gleiche Puffermenge enthalten ist.

Die Tropfengröße der verwendeten Bürette sollte zwischen 0,01 und 0,015 ml liegen. Daher ist es empfehlenswert, einen möglichst fein ausgezogenen Bürettenauslauf zu wählen.

Die genauesten Titrationsergebnisse erhält man wie folgt: man titriert zuerst die Probe gegen den Leerwert bis zur angenommenen Farbgleichheit und merkt sich den Natronlaugenverbrauch. Anschließend titriert man die Probe langsam weiter, wobei man nach jeweils etwa 20 μ l verbrauchter NaOH die Färbung der Probe mit der des Leerwerts vergleicht. Dieses Verfahren führt man so lange fort, bis die Probe deutlich von der Färbung des Leerwerts abweicht. Die bis zu diesem letzten Titrationsschritt verbrauchte Natronlauge stellt hinreichend genau den richtigen Endpunkt der Titration dar.

Nach kurzer Einarbeitungszeit wird man sich nur noch durch einen zusätzlichen Titrationsschritt von der richtig erkannten Farbgleichheit überzeugen müssen.

Wird in der Probe eine Lipaseaktivität über 1800 U/l bestimmt, ist der Test mit 0,1 ml Serum oder entsprechend weniger erneut anzusetzen.

Optimale Reaktionsbedingungen wurden durch folgende Testbedingungen erhalten:

1. Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom pH

Die Testansätze wurden unter den oben beschriebenen Standardbedingungen mit einem Normal- und einem Pankreatitisserum durchgeführt. Bei beiden Seren lag das pH-Optimum der Lipase bei pH 8,6 und ihre pH-Optimum-Kurven unterschieden sich nur unwesentlich voneinander. Oberhalb pH 8,6 fällt die Lipaseaktivität steil ab, während sie nach der sauren Seite zu erst unter pH 8,3 deutlich abfällt (Abb. 3). Eine Spontanhydrolyse des Substrats ist bei 25°C erst ab pH 8,9 meßbar.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit den von WEBER, TIETZ und YANG u. BIGGS (8,10,70) bestimmten pH-Optimum der Lipase von 8,0. TIETZ fand sogar mehrere pH-Optima im Serum des glei-

chen Patienten und hält dies für einen Hinweis auf die Heterogenität der Serumlipase. Bei pH 8,0 wird nur 30 % der maximalen Lipaseaktivität gemessen.

Vergleicht man den Verlauf dieser pH-Optimum-Kurve mit der RICK'schen Methode, so fällt auf, daß die beiden Kurven oberhalb von pH 8,2 bis zum pH-Optimum gleich verlaufen; unterhalb von pH 8,2 und oberhalb von pH 8,6 fällt aber die Kurve der modifizierten Methode wesentlich steiler ab als bei der RICK'schen Methode. Dieser von der Referenzmethode abweichende Kurvenverlauf ist sehr wahrscheinlich in einer pH abhängigen kontinuierlichen Verschlechterung der Reaktionsbedingungen zu suchen, die bei der zweistündigen Inkubationszeit eher in Erscheinung treten wird als bei der 10 bis 15 minütigen der RICK'schen Methode.

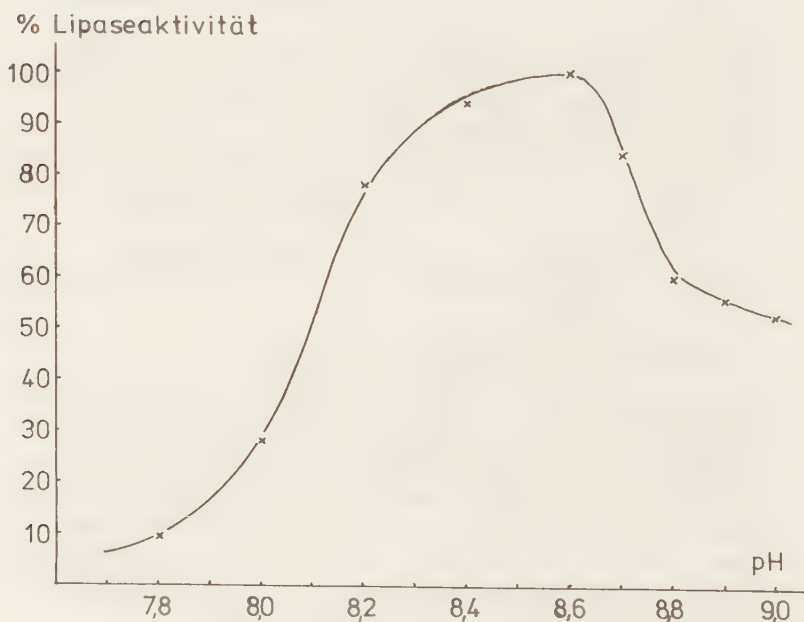


Abb. 3

Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom pH abzüglich der Spontanhydrolyse; Mittelwerte zweier Seren (150 und 550 U/l)

2. Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Substratkonzentration

Es wurden ein Normal- und ein Pankreatitiss Serum untersucht. Die Puffer- und die Na-Glykocholatkonzentrationen wurden in jedem Testansatz konstant gehalten und stimmten mit dem Standardtest überein. Abb. 4 läßt für höhere Lipaseaktivitäten ein breites Substratoptimum bei 0,2 bis 0,3 ml Olivenöl pro ml Substrat-Puffer-Lösung erkennen, während das Normalserum ein nur schmales Substratoptimum zwischen 0,25 und 0,3 ml Olivenöl pro ml Substrat-Puffer-Lösung zeigt. So wurde für den Standardtest eine Olivenölkonzentration von 0,25 ml pro ml Substrat-Puffer-Lösung gewählt.

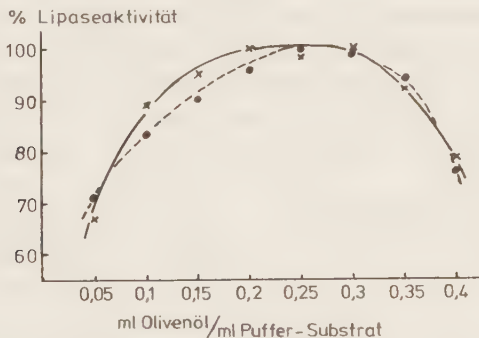


Abb. 4

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Substratkonzentration

● — 150 und x — x 630 U/l

3. Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Tris-Pufferkonzentration

Es wurden zwei Pankreatitisseren in den Testansatz eingesetzt. Die Substrat- und Na-Glykocholatendkonzentrationen blieben konstant und entsprachen den Standardtestbedingungen. Beide Seren ergaben beinahe identische Ergebnisse. Ab einer 50 mM Tris-Pufferkonzentration (pH 8,6 bei 25°C) ist durch eine weitere Erhöhung der Pufferkapazität keine Lipaseaktivitätszunahme mehr zu erreichen (Abb. 5). Da der Titrationsendpunkt

in einem höher gepufferten Ansatz nur sehr unscharf zu erkennen ist und hieraus eine größere Ableseungenauigkeit resultiert, wurde eine 50 mM Tris-Pufferendkonzentration für den Standardtest für ausreichend gehalten.

Selbst der pH-Wert eines Probenansatzes mit einer Serumlipaseaktivität von 1200 U/l fällt von pH 8,6 nur um 0,2 pH-Einheiten auf pH 8,4 ab. Somit verbleibt auch diese hohe Lipaseaktivität während der Inkubationszeit noch über der 90 %-Marke der pH abhängigen, optimalen Lipaseaktivität und kann immer noch mit genügender Genauigkeit erfaßt werden.

Wie schon weiter oben erwähnt, reicht diese Pufferkapazität des Ansatzes aus, um bis zu 1800 U/l eine beinahe maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Lipase innerhalb der zweistündigen Inkubationszeit zu gewährleisten.

Durch die Serumzugabe zur Puffer-Substrat-Lösung wird der pH-Wert des Testansatzes in den meisten Fällen nicht oder nur um ein bis zwei hundertstel pH-Einheiten zur sauren Seite hin verändert.

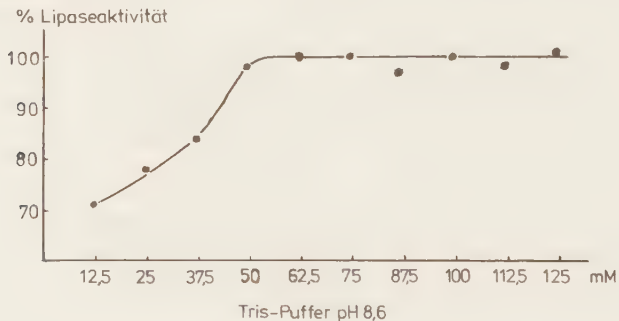


Abb. 5

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Tris-Pufferendkonzentration; Mittelwerte zweier Seren (510 und 760 U/l)

4. Na-Glykocholat als Aktivator der Lipaseaktivität

Die Messungen wurden mit einem Normal- und einem Pankreatiss serum (150 u. 320 U/l) nach den Standardtestbedingungen durchgeführt, wobei die Na-Glykocholatendkonzentrationen im Ansatz variierten. Bei beiden Seren liegt die optimale Glyko-

cholatendkonzentration bei 0,68 mM (Abb. 6). Durch höhere Na-Glykocholatkonzentrationen wird die Olivenölhydrolyse zunehmend gehemmt. Deshalb wurde diese Glykocholatendkonzentration in den Standardtest eingesetzt. Na-Glykocholat wirkt wahrscheinlich über eine Stabilisierung der Olivenölemulsion indirekt auf die Lipaseaktivität ein, indem sie als Emulgator an der Olivenöl-Wasser-Grenzschicht bessere Reaktionsbedingungen für die Lipase bietet.



Abb. 6

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Natrium-Glykocholatendkonzentration; Mittelwerte zweier Seren (150 und 320 U/l)

Optimale Meßbedingungen wurden durch folgende Maßnahmen erzielt:

1. WEBER inaktiviert im Gegensatz zu TIETZ den Leerwert schon zu Beginn der Inkubationszeit. Dieses Vorgehen spart eine zusätzliche Serumpipettierung in die Leerwertansätze nach der Inkubationszeit ein. Doch muß man sich diesen arbeitstechnischen Vorteil mit zwei nicht zu unterschätzenden Meßfehlern erkaufen.

Erstens kann man die Lipase im Serum durch das gewählte Ethanolvolumen nur unvollständig inaktivieren. So wird also auch während der Inkubationszeit im Leerwert Olivenöl hydrolysiert und es resultiert eine geringere Differenz des Natronlaugeverbrauches vom Leerwert zur Probe; das heißt, die Lipaseakti-

vitäten werden zu niedrig gemessen. Dies erkennt man unter anderem am Natronlaugenverbrauch des Leerwerts, der um so höher ausfällt, um so aktiver die Serumlipase ist. Eine bessere Inaktivierung der Lipase ist durch ein größeres Äthanolvolumen in den Ansätzen nicht erreichbar, da man hierdurch den Endpunkt der Titration nur noch sehr schlecht ablesen kann. Bei der Inaktivierung des Leerwerts vor der Inkubierung werden bei dem hier vorgestellten Test 14 % niedrigere Lipaseaktivitäten als im Standardtest bestimmt. Abb. 7 zeigt diesen deutlichen Verlust an meßbarer Lipaseaktivität. Dieser Effekt spielt erst oberhalb des Normalbereichs von 150 U/l eine größere Rolle, da der Meßfehler bei dieser Enzymaktivitätshöhe noch im 2s-Bereich der Methode liegt. Um die Aussagekraft des Tests bei erhöhten Lipaseaktivitäten nicht zu schmälern, wird beim Standardtest das Serum erst nach der Inkubationszeit zum Leerwert gegeben.

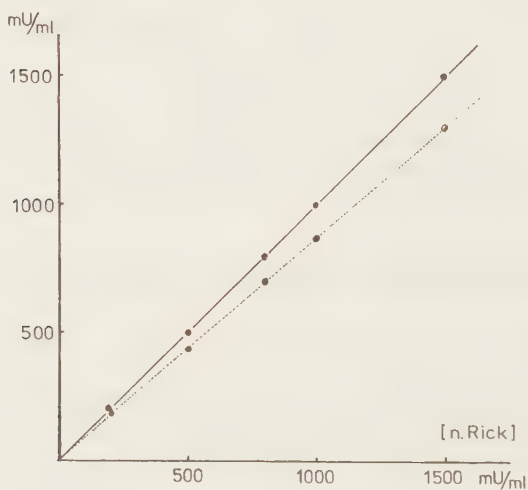


Abb. 7

Abhängigkeit der meßbaren Lipaseaktivität vom Seruminkubierungszeitpunkt des Leerwerts

- - - - - • vor der Inkubation
- - - - - • nach der Inkubation

Der zweite Punkt betrifft die zur Verfügung stehende Meßdauer nach Unterbrechung der Olivenölhydrolyse.

Bestimmt man die Lipaseaktivität eines Serums nach dem Standardtest, wobei aber der Leerwert vor der Inkubation inaktiviert wurde, in Abhängigkeit des Zeitintervalls, gerechnet vom Inkubationsende bis zur Titration der Ansätze, so kann man Folgendes beobachten: nach Inkubationsende steigt die gemessene Lipaseaktivität stetig an, um nach 60 Minuten eine etwa 25 %ige und nach 90 Minuten eine 35 %ige Erhöhung der Meßergebnisse vom Ausgangswert zu erreichen.

Auch dieser Effekt basiert auf der nur unvollständigen Inaktivierung der Ansätze durch Äthanol. Die Olivenölhydrolyse des Probenansatzes läuft der des Leerwerts davon, da die Inaktivierung der Lipase im Leerwert vollständiger ist als die im Probenansatz, in dem das Äthanol in die vorgelegte Puffer-Substrat-Lösung gegeben wird und nur verdünnt an das Enzymprotein gelangt. Es resultiert eine immer größer werdende Differenz des Natronlaugenverbrauchs von Leerwert und Probe. Diese inkomplette Inaktivierung der Lipase ist durch Quecksilber-II-Chlorid Zusatz zum Äthanol auf etwa die Hälfte zu reduzieren. Der Natronlaugenverbrauch der Ansätze steigt durch diese Maßnahme erheblich an. Ebenfalls verschlechtert die saure HgCl_2 -Lösung bei Pipettierfehlern die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse. Chloroform eignet sich bei diesem Testverfahren nicht als Inaktivierungsmittel der Lipase.

Alle diese Schwierigkeiten können umgangen werden, wenn man wie im Standardtest empfohlen, Leerwert und Probe nach der Inkubationszeit mit Äthanol abstoppt. So ist bis mindestens 90 Minuten nach Inkubationsende auch bei hohen Lipaseaktivitäten keine höhere Lipaseaktivität meßbar als sogleich nach Inaktivierung. Der Inaktivierungsgrad der Lipase ist nun im Leerwert und in der Probe gleich. Der Natronlaugenverbrauch des Leerwerts nimmt bei einer Serumlipaseaktivität von 860 U/l innerhalb von 90 Minuten um 0,12 ml zu.

2. Enzymstabilität während der Inkubationszeit:

Immer wieder wird behauptet, daß die Lipase während einer langdauernden Inkubationszeit inaktiviert werden und an Aktivität abnehmen könnte. Nicht zuletzt schloß man dies aus bisher gekrümmten Zeit-Umsatzkurven der meisten Lipasemethoden.

Nach der RICK'schen Methode wurde ein Serum (360 U/l) während zwei Stunden dreimal titriert. Es war nach dieser Zeit kein Aktivitätsverlust der Lipase nachweisbar. Um eine eventuelle Inaktivierung der Lipase bei höheren Temperaturen zu erkennen, wurden zwei Seren (420 und 530 U/l) jeweils vier Stunden bei 4°C bei 25°C und bei 37°C inkubiert. Im Vergleich zu den bei 4°C gelagerten Seren, zeigten die bei 37°C inkubierten Seren einen geringen Aktivitätsverlust der Lipase unter 10 %, während bei den bei 25°C deponierten Seren kein Aktivitätsverlust nachweisbar war.

3. Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Inkubationstemperatur:

Den Einfluß der Inkubationstemperatur auf den Substratumsatz zeigt Abb. 8. Die Lipaseaktivität eines Pankreatitisserums (355 U/l) wurde in einem Ansatz nach der Referenzmethode bei verschiedenen Reaktionstemperaturen gemessen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß von Meßwert zu Meßwert eine Zeitspanne von etwa 20 Minuten lag.

Die rechts vom Temperaturoptimum gelegenen Meßwerte sind durch die fortlaufende Enzyminaktivierung sehr zeitabhängig. Das Temperaturoptimum liegt unter diesen Versuchsbedingungen bei 35°C und fällt zu höheren Inkubationstemperaturen steil ab. Bei 50°C ist keine Lipaseaktivität mehr nachweisbar. Die Serumlipase wird schon bei einer Inkubationstemperatur von 37°C inaktiviert. Der Q_{10} - Wert zwischen 25 und 35°C beträgt 1,2.

Mit dem hier vorgestellten modifizierten Lipasetest wird unter Standardbedingungen ein Q_{10} - Wert zwischen 25 und 35°C von 1,35 erreicht.

Auf Grund der besseren Enzymstabilität bei 25°C, auch wegen der größeren Stabilität der Substratemulsion bei niederen

Temperaturen und nicht zuletzt als ein Beitrag zur Standardisierung der Reaktionstemperatur von Enzymbestimmungen (73, 92), wurde 25°C als Meßtemperatur gewählt, obwohl man hierdurch einen niedrigeren Substratumsatz hinnehmen muß.

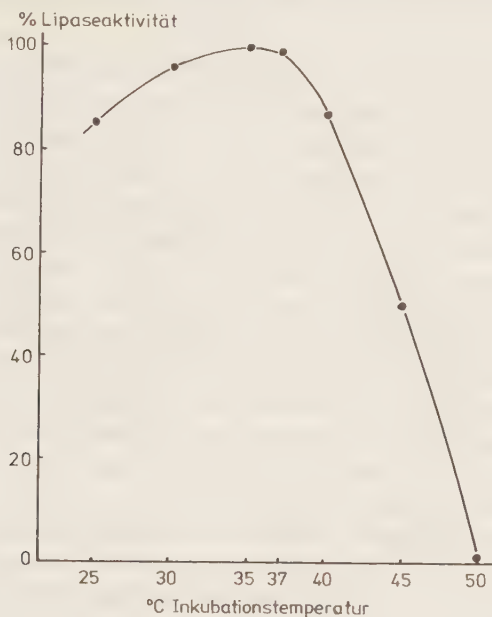


Abb. 8

Einfluß der Inkubationstemperatur auf den Substratumsatz

Die Lipaseaktivität eines Pankreatitisserums (355 U/l) wurde in einem Ansatz nach der Referenzmethode bei verschiedenen Reaktionstemperaturen gemessen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß von Meßwert zu Meßwert eine Zeitspanne von etwa 20 Minuten lag.

4. Einfluß der Natronlaugenkonzentration auf die Meßergebnisse:

Durch eine weniger konzentrierte Natronlauge wurde der Berechnungsfaktor niedrig gehalten. Bei einer 0,025 N Natronlauge ist der Indikatorumschlag am Titrationsendpunkt pro Natronlaugenquantum noch einigermaßen scharf zu erkennen. Bei noch niedrigerer Normalität wird der Arbeitsaufwand der Titration höher und die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse

schlechter. Der Titrationsendpunkt der Probe wird bei vorgegebenem Leerwert innerhalb von 60 μ l 0,025 N NaOH erreicht; gerechnet vom deutlichen Farbunterschied vor und nach der Farbgleichheit mit dem Leerwert.

5. Verkürzung des Arbeitsaufwands bei Provokationstests:

Leider ist es nicht möglich in einer Meßreihe alle Proben gegen einige wenige zufällig ausgewählte Leerwerte zu titrieren und so viel Arbeit und Zeit einzusparen. Da erstens die Lipase nicht vollständig zu inaktivieren ist und besonders hohe Lipaseaktivitäten in den Leerwerten deren Natronlaugenverbrauch nach der Inkubation ständig erhöhen, so daß die Aktivitäten der Proben zu niedrig oder im umgekehrten Fall zu hoch gemessen würden. Zum anderen findet beim Titrationsendpunkt, der etwa bei pH 10,5 liegt, in den titrierten Ansätzen eine Spontanhydrolyse des Olivenöls statt, die den Indikator langsam entfärbt. Die CO_2 -Absorption aus der Luft spielt dabei keine Rolle, da auch verschlossene Ansätze gleichermaßen entfärbt werden.

Die während 3 bis 4 Minuten eintretende Spontanhydrolyse und möglicherweise noch vorhandene restliche Lipaseaktivität im Leerwert ist zu vernachlässigen, so daß man einen Sekretin- oder Pankreozymin-test eines Patienten gegen einen Leerwert titrieren kann, ohne die Aussagekraft des Tests zu mindern. Dieser Leerwert muß aber mit einem Serum des gleichen Patienten angesetzt werden.

6. Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Inkubationszeit:

Wie schon weiter oben erwähnt, ist der zeitliche Verlauf der Olivenölhydrolyse unter den von WEBER angegebenen Testbedingungen nicht linear. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist am Anfang am größten und wird erst nach 6 Stunden linear (8). Bei dem hier vorgestellten Test verläuft die Zeit-Umsatzkurve von Anfang an über die gesamte, zweistündige Inkubationszeit linear (Abb. 9). Die lineare Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Inkubationszeit wurde wahrscheinlich durch die Optimierung der Reaktions- und Meßbedingungen erreicht.

Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf eine Stunde ist möglich, aber nicht empfehlenswert, da der Ablesefehler bei der Titration gleich groß bleibt, und sich hierdurch die Trennschärfe der Meßergebnisse besonders im Grenzbereich verschlechtert.

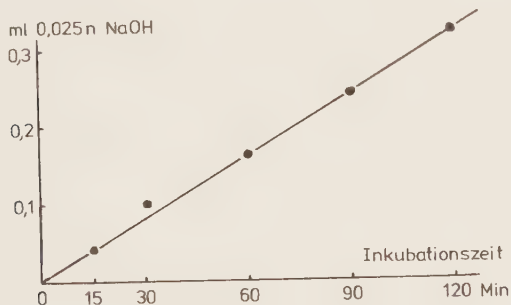


Abb. 9 a

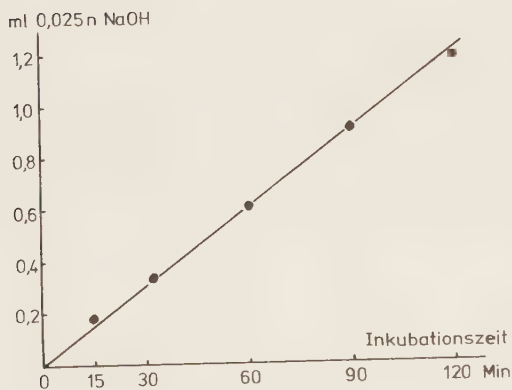


Abb. 9 b

Abb. 9

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Inkubationszeit

- a) Pankreatitiss serum mit 330 U/l Lipaseaktivität
- b) Pankreatitiss serum mit 1230 U/l Lipaseaktivität

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Lipasekonzentration:

Der Lipaseaktivitätsgehalt einzelner Seren wurde durch die Referenzmethode bestimmt. Die Meßergebnisse wurden mit einem selbst hergestellten Testserum kontrolliert. Dessen Sollwert und Standardabweichung wurden in einer Vorperiode bestimmt. Die bekannten Seren wurden einmal in den Test nach WEBER (Abb. 10) und in den hier vorgestellten, verbesserten Lipasetest eingesetzt (Abb. 11).

Die Standardkurve der WEBER'schen Lipasebestimmungsmethode verläuft von Beginn an gekrümmt, während die Standardkurve der neuen Methode bis 1800 U/l linear verläuft. Lipaseaktivitäten über 1800 U/l setzen den pH-Wert des Probenansatzes zu sehr herab, so daß eine Abnahme der meßbaren Lipaseaktivität resultiert. Bei 2000 U/l wird im Probenansatz nach der Inkubation etwa pH 8,2 und bei 3000 U/l etwa 8,0 erreicht. Wurden mit dem Standardtest Lipaseaktivitäten über 1800 U/l gemessen, so muß der Test mit entsprechend weniger Serum im Ansatz wiederholt werden.

Bei einer Lipaseaktivitätsänderung im Serum erhält man mit dem verbesserten Lipasetest viel höhere Ausschläge der Lipaseaktivität als mit der WEBER'schen Methode (Abb. 10 und 11). Diese höhere Auflösung der Testergebnisse ist besonders im Grenzbereich und bei Verlaufskontrollen von großem diagnostischen Wert.

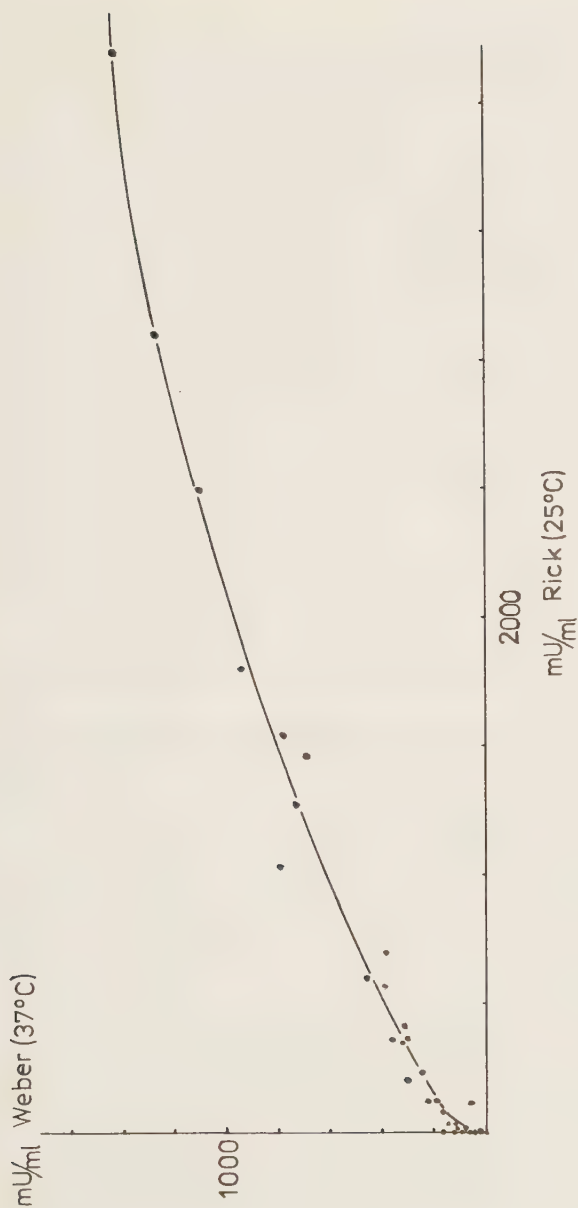


Abb. 10

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Lipasekonzentration
Die Lipaseaktivität einzelner Seren wurde jeweils durch die Referenzmethode (25°C) und durch die Methode nach WEBER (37°C) bestimmt.



Abb. 11

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Lipasekonzentration

Die Lipaseaktivität einzelner Seren wurde jeweils durch die Referenzmethode (25°C) und durch die modifizierte Lipasebestimmungsmethode (25°C) bestimmt.

3.1.4. SCHNELLMETHODE

Die nun folgende Schnellmethode ist eine Modifikation des Lipaseschnelltests der Firma E. Merck in Darmstadt (Merckognost Lipase Art.-Nr. 11000) (43).

Bei diesem Test werden die bei der Olivenölhydrolyse freierwerdenden Protonen durch die Farbänderung eines pH-Indikators gemessen. Der Indikator wird vor Testbeginn zur Olivenölemulsion hinzugegeben. Dabei ist die Farbumschlagsgeschwindigkeit des Indikators in einem begrenzten Bereich direkt proportional der Lipaseaktivität im Serum. Zur Durchführung dieser Tests bedarf es keines apparativen Aufwands.

Die pH-Änderung des Testansatzes kann aber auch direkt mit einem pH-Meter gemessen werden.

Dieser Schnelltest ist als reiner Suchtest konzipiert worden, der hauptsächlich eine verlässliche ja-nein Antwort geben sollte. Er kann daher kein Ersatz für qualifizierte Lipasebestimmungsmethoden sein.

Dazu mußten folgende Bedingungen erfüllt werden: einfache Testdurchführung, möglichst hohe Trennschärfe im Grenzbereich zwischen normalen und pathologischen Enzymaktivitäten und geringer Zeitbedarf der Lipaseaktivitätsbestimmung.

1. Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom pH:

Der Reaktionsverlauf der durch die Lipase katalysierten Olivenölhydrolyse wurde durch folgenden Versuch objektiviert: In 2 ml Olivenölemulsion mit den im Standardtest gültigen Endkonzentrationen aber ohne Indikatorzusatz wurden 0,2 ml Serum (170 U/l) gegeben und die pH-Änderung mit einem pH-Meter gemessen. Die Inkubationstemperatur betrug 23°C (Zimmertemperatur) (Abb. 12).

Die Enzymreaktion verläuft von pH 8,8 bis 8,25 linear. Ab pH 8,25 wird sie zunehmend gehemmt, unabhängig von der Laufzeit des Tests (Inkubationsdauer) (s. Abb. 12 u. 13).

Da die Lipase durch wiederholtes Alkalisieren des Testansatzes wieder reaktiviert werden kann, beruht diese Enzymhemmung hauptsächlich auf der pH-Verschiebung des Testansatzes.

Zu dieser pH abhängigen Enzymhemmung gesellt sich noch eine

Produkthemmung hinzu. Diese zusätzliche Enzymhemmung ist wahrscheinlich auf die Anhäufung der abgespaltenen Fettsäureanionen zurückzuführen, da durch wiederholtes Alkalisieren eines Testansatzes die Zeitumsatzkurve bis pH 8,25 immer linear verläuft, aber in der Zeiteinheit immer geringere pH-Differenzen als im vorhergehenden Versuch erreicht werden.

Aus Abb. 12 und 13 ist weiter ersichtlich, daß man den Startpunkt der Lipaseaktivitätsmessung so weit wie möglich gegen pH 8,8 legen sollte, um pro Zeiteinheit eine große pH-Differenz zu erreichen. Im modifizierten Lipaseschnelltest wurde auf Grund des optimalen Indikatorumschlagbereichs pH 8,7 als Startpunkt gewählt.

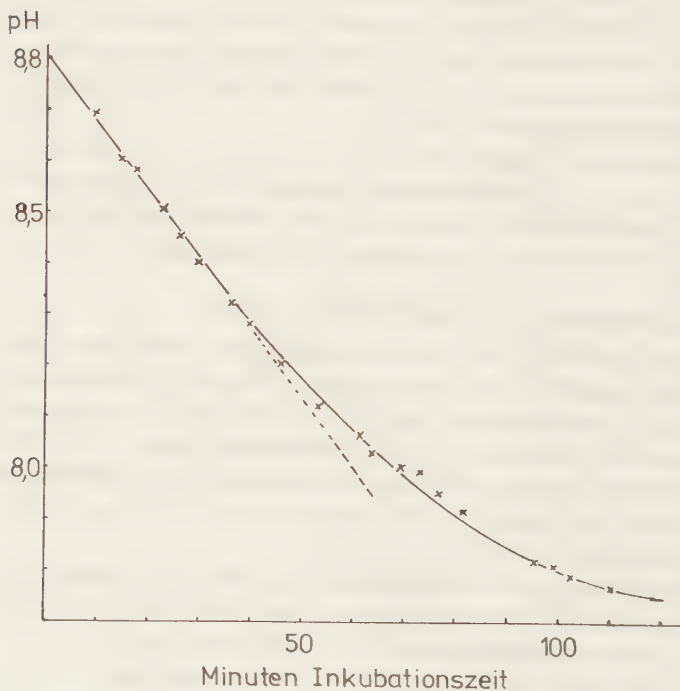


Abb. 12

Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom pH

In 2 ml Olivenölemulsion (0,105 ml Olivenöl/ml EV) wurden 0,2 ml Serum (170 U/l) gegeben. Messung des pH-Werts durch pH-Meter; Inkubationstemperatur = 23°C.

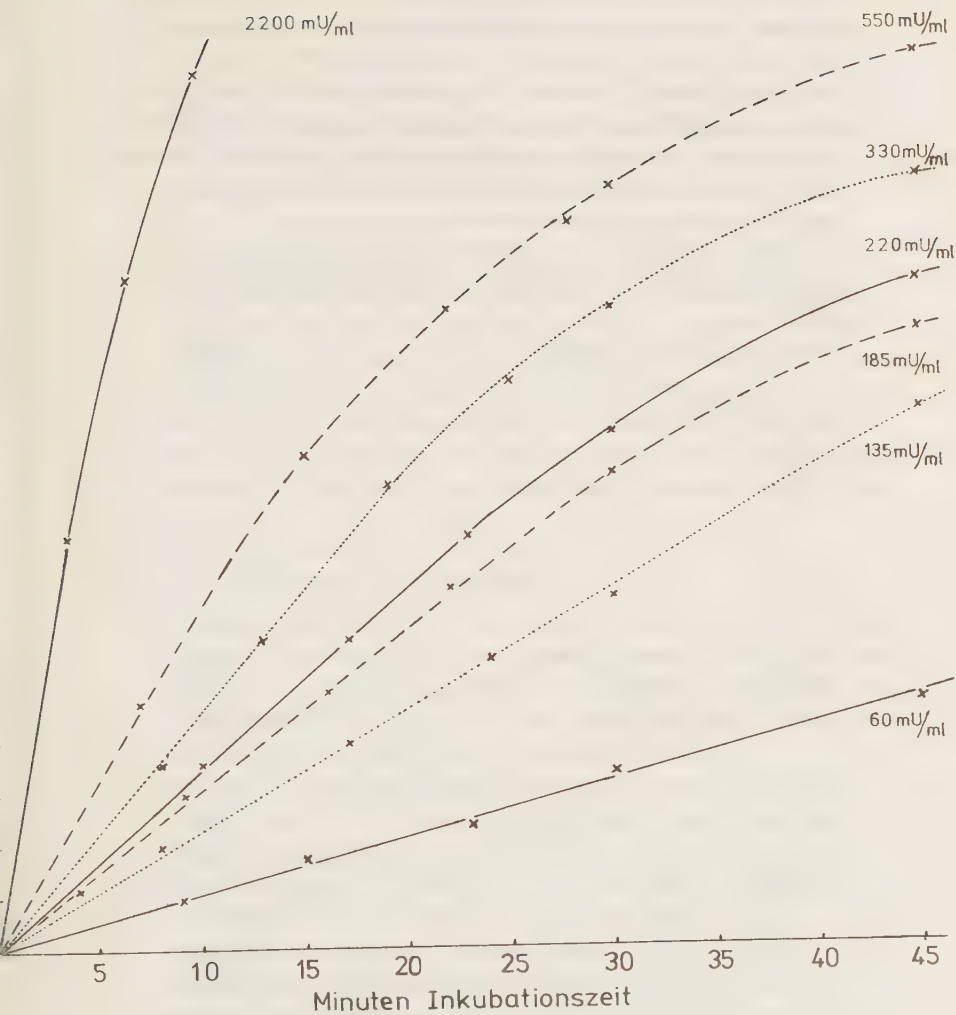


Abb. 13

Zeitumsatzkurven

0,2 ml Serum in 2 ml Olivenölemulsion (0,105 ml Olivenöl/ml EV); Messung des pH-Werts durch pH-Meter; Inkubationstemperatur = 22°C.

Beim Merck'schen Lipaseschnelltest startet man den Testansatz bei etwa pH 8,3. Es wird also nicht der steilere, lineare Abschnitt der Zeitumsatzkurve voll ausgenutzt. Dies bedeutet eine immer kleiner werdende pH-Differenz pro Zeiteinheit und damit eine geringere Farbumschlagsgeschwindigkeit des Indikators. Dieser methodische Nachteil erfordert bei Seren bis 400 U/l eine zweistündige Inkubationszeit, um einen beurteilbaren Farbumschlag des Testansatzes zu erreichen.

2. Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Substratkonzentration:

Es wurden ein Normalserum (110 U/l) und zwei Pankreatitis-

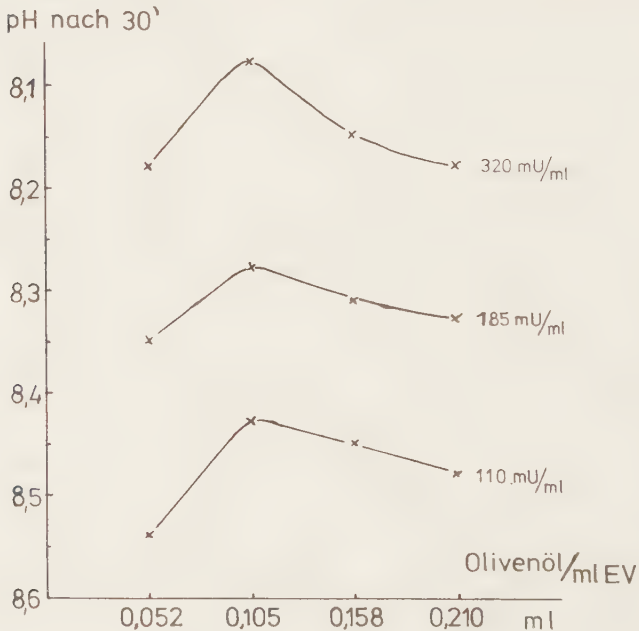


Abb. 14

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Substratendkonzentration
0,2 ml Serum zu 2 ml Olivenölemulsion, eingestellt auf Anfangs-pH-Wert 8,7; Messung des pH-Werts nach 30 minütiger Inkubation bei 22°C mit pH-Meter.

seren (185 u. 320 U/l) getestet. Die Testansätze wurden, wie im Standardtest angegeben, angesetzt und bei Zimmertemperatur (22°C) 30 Minuten inkubiert.

Bei allen drei Seren liegt ein eindeutiges Substratoptimum bei einer Olivenölkonzentration von 0,105 ml Olivenöl/ml EV. Zu höheren oder niedrigeren Olivenölkonzentrationen hin fällt die Lipaseaktivität ab (Abb. 14).

3. Einfluß des Na-Glykocholats auf die Lipaseaktivität:

Bei diesem Schnelltest ist durch eine Na-Glykocholatzugabe zum Testansatz eine Lipaseaktivitätserhöhung nicht erreichbar. Die Lipase wird sogar durch eine ansteigende Na-Glykocholatkonzentration zunehmend gehemmt. Diese Hemmung beruht wahrscheinlich auf der relativ hohen Albuminkonzentration im Test, da die durch Na-Glykocholat hervorgerufene Lipaseaktivierung zum Teil auch durch Humanalbumin bewirkt werden kann (7).

4. Stabilität der Olivenölemulsion:

Leider ist das Substrat nicht sehr beständig. Es findet auch unterhalb von pH 8,9 eine allerdings langsam verlaufende Saponinhydrolyse des Olivenöls statt, die bis zu etwa pH 5,5 immer geringer wird. Ein auf pH 5,5 eingestelltes Substrat bleibt mindestens drei Monate mit seinem pH-Wert stabil.

Ein auf pH 8,7 eingestelltes Substrat wird mit oder ohne Zugabe eines bei 56°C inaktivierten Serums nach 30 minütiger Inkubierung bei Zimmertemperatur um 0,07 pH-Einheiten saurer. Diese pH-Abnahme ist durch eine CO₂-Absorption aus der Raumluft bedingt. Seren mit einer sehr niedrigen oder sogar fehlenden Lipaseaktivität bewirken während der Inkubationszeit meistens eine pH-Änderung des Testansatzes unter 0,07 pH-Einheiten oder sogar keine pH-Änderung. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet, die Probengefäße vor der Inkubation zu verschließen.

Teilt man die Testansätze auf zwei Probengefäße auf und verschließt ein Gefäß luftdicht, so ist nur bei Seren mit Lipaseaktivitäten unter 20 U/l im nicht verschlossenen Testansatz gelegentlich eine höhere pH-Änderung zur sauren Seite hin zu

beobachten als im verschlossenen Ansatz. Bei höheren Lipaseaktivitäten sind die Ergebnisse beider Ansätze identisch.

5. Wahl des Indikators:

Der Normalbereich der Lipaseaktivität im Serum reicht bis 155 U/l ($\bar{x} + 3s$).

Während einer Inkubationszeit von 30 Minuten entspricht im linearen Abschnitt der Zeit-Umsatzkurve ein Lipaseaktivitätsintervall von 40 U/l einem pH-Abfall um 0,1 pH-Einheiten (Abb. 17). Der Grenzwert von 160 U/l entspricht demnach 0,4 pH-Einheiten, vorausgesetzt er liegt im linearen Bereich (Abb. 12).

Da der Schnelltest möglichst bei pH 8,8 gestartet werden sollte, war es notwendig einen pH-Indikator zu suchen, der seinen pK-Wert bei pH 8,4 - 8,2 hat. Diese Forderung erfüllt vor allem m-Kresolpurpur. Dieser und andere Indikatoren wie Kresolrot, 3-Nitrophenol, Phenolrot, Thymolblau, p-Xylenolblau und Phenolphthalein wurden in verschiedenen Konzentrationen und mit oder ohne Methylenblauzusatz zum Testansatz gegeben und ausgetestet. Mischindikatoren, die aus den genannten Indikatoren zusammen gesetzt sind, führten nicht zum gewünschten Erfolg. Phenolphthalein hemmt die Lipase sehr, so daß es als Indikator für diesen Test ausschied. Auch die Farbumschlagtrennschärfe der zuletzt genannten Indikatoren konnte in dem vorgegebenen Grenzbereich nicht überzeugen, so daß nur noch m-Kresolpurpur und Kresolrot zur Wahl standen. Beide Indikatoren hemmen die Lipase in den angewandten Konzentrationen nicht. m-Kresolpurpur zeigte in dem zur Frage stehenden pH-Intervall die deutlicheren Farbunterschiede als Kresolrot, das mit seinem pK-Wert bei 7,9 liegt. Aus diesem Grund wurde m-Kresolpurpur, das auch beim MERCKOGNOST Lipasetest als Indikator dient, für diesen Test beibehalten.

Bei den in Frage kommenden pH-Werten von 8,8 - 7,8 zeigt die im Standard enthaltene m-Kresolpurpurkonzentration von 0,12 mg/ml EV die am deutlichsten sichtbaren Farbunterschiede (Abb. 15). Durch den am schärfsten sichtbaren Umschlagsbereich des m-Kresolpurpurs bei pH 8,3 bis 8,2 und auf Grund einer pH-Differenz von 0,4 Einheiten entsprechend einer Lipaseaktivi-

tät von 160 U/l, resultiert ein Start-pH des Testansatzes von 8,7 - 8,6.

Der Start des Testansatzes ist bei pH 8,7 besonders vorteilhaft, da so die Farbauftrennung des Indikators am Start und im Grenzbereich am günstigsten sind. Auf Grund der beiden oben genannten pH-Grenzmarken 8,7 und 8,3 oder 8,6 und 8,2 wird unter den vorgenannten Substratendkonzentrationen im Standardtest automatisch die Inkubationszeit auf 30 Minuten festgesetzt, da während diesem Zeitintervall eine Serumlipaseaktivität von 160 U/l im Testansatz einen pH-Abfall von 0,4 pH-Einheiten verursacht.

6. Anfertigung der kalibrierten Farbskala:

Es ist ohne weiteres möglich den Lipaseschnelltest auch ohne Farbskala durchzuführen. Hierbei wird die durch die Lipase bewirkten pH-Differenzen im Testansatz direkt mit dem pH-Meter gemessen (Abb. 13). Auch zur Herstellung der Farbstandards wird ein pH-Meter benötigt. Sie werden folgendermaßen angesetzt: In ein Probengefäß gibt man 1 ml Olivenölemulsion und 1 ml Puffer-Indikatorlösung, hergestellt aus 100 ml 1 M Trispuffer, etwa pH 8,4, in dem 24 mg m-Kresolpurpur gelöst werden. Um den Eiweißfehler des Indikators im Testansatz auszugleichen, muß man zum Standardansatz 0,2 ml Serum hinzugeben, das zuvor bei 56°C zwei Stunden lang inaktiviert wurde. Die einzelnen Standards werden mit Salzsäure oder Natronlauge auf den gewünschten pH-Wert eingestellt, wobei man am besten mit pH 8,8 beginnt und die folgenden Standards jeweils mit 0,1 pH-Einheiten Abstand einstellt. Die Probengefäße werden luftdicht verschlossen.

Um den pH-Wert richtig einstellen zu können, bedarf es eines Farbvergleichs auch oberhalb von pH 8,7 damit ein Übertitrieren des Ansatzes vermieden wird. Aus diesem Grund sollte auch ein Standard mit einem pH 8,8 entsprechenden Farbwert vorhanden sein. Der Tris-Puffer verändert die Farbe des Indikators nicht. Die pH-Einstellung der Standards ist nach zwei Tagen unbedingt zu überprüfen. Sie sind leider nur 7 Tage haltbar, da der Indikator in der Emulsion verändert wird, so daß es notwendig war, die Farbabstufungen dauerhaft auf Farbtafeln

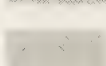
	Skalenwert	U/l Lipaseaktivität
	8,8	
	8,7	0
	8,6	40
	8,5	80
	8,4	120
	8,3	160
	8,2	210
	8,1	280
	8,0	400
	7,9	600
	7,8	> 600

Abb. 15

Kalibrierte Farbskala für den Lipaseschnelltest

Die Skalenwerte entsprechen den im Testansatz gemessenen pH-Werten. Die aufgeführten Lipaseaktivitäten gelten nur bei einem Testansatzstart bei pH 8,7 und einer 30 minütigen Inkubationszeit bei Zimmertemperatur. (Aus drucktechnischen Gründen wurden die Farbtafeln durch Graustufungen ersetzt).

festzuhalten.

Die Farbtafeln (Abb. 15) wurden mit Plaka-Farben (Pelikan) hergestellt. Die in Wasser aufgeschwämmten Caseinfarben wurden im Verhältnis 1:4 mit Methanol gemischt und mehrmals unter zwischenzeitlichem Trocknen auf Pappe (Schoellershammer, Hammer 4 G) aufgesprüht. Die zuvor beschriebenen Standards dienten den Farbtafeln als Vorlage.

Da nur einzelne Farbstufen auf den Farbtafeln festgehalten wurden, die einen Abstand von jeweils 0,1 pH-Einheiten haben, ist die Ablesegenauigkeit der Testergebnisse bis auf einen Zwischenwert innerhalb einer Farbstufe beschränkt. Dadurch wird die Ablesegenauigkeit des Schnelltests bis zu einer Lipaseaktivität von 180 U/l auf 20 U/l begrenzt. Ein kontinuierliches Farbband würde die Ablesung der Testansatzfarbwerte wesentlich genauer gestalten und auch vereinfachen.

7. Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Lipasekonzentration und Kalibrierung der Farbskala:

Die Lipaseaktivität einzelner Seren wurde durch die Referenzmethode, den modifizierten Lipasetest und der Originalbestimmungsmethode nach WEBER bestimmt und mit dem Lipaseschnelltest verglichen, wobei die Testergebnisse unter Verwendung der Farbskala (Abb. 15) abgelesen und in Farbskaleneinheiten ausgedrückt wurden. Um den Ablesefehler auf der Farbskala schon bei Testbeginn möglichst niedrig zu halten, wurde bei jedem Testansatz ein Start-pH-Wert von 8,7 gewählt.

Bei Verwendung der diskontinuierlichen Farbskala ist die Ablesegenauigkeit des Schnelltests auf jeweils 20 U/l begrenzt. Mit einem kontinuierlichen Farbband würden etwa 10 U/l erreicht werden.

Abb. 16 zeigt die Lipaseschnelltestergebnisse im Vergleich zur Referenzmethode. Es besteht bis zu 8,2 Skaleneinheiten entsprechend einer Lipaseaktivität von 215 U/l eine lineare Beziehung. Oberhalb 215 U/l, d.h. bei pH-Werten unter 8,2, werden mit der Schnellmethode zu niedrige Werte gefunden. Dieser Verlust an messbarer Lipaseaktivität ist auf die pH-Reaktion des Enzyms zurückzuführen (s.S. 35). Kalibriert man die Farbskala des Schnelltests nach den Lipaseaktivitäten der

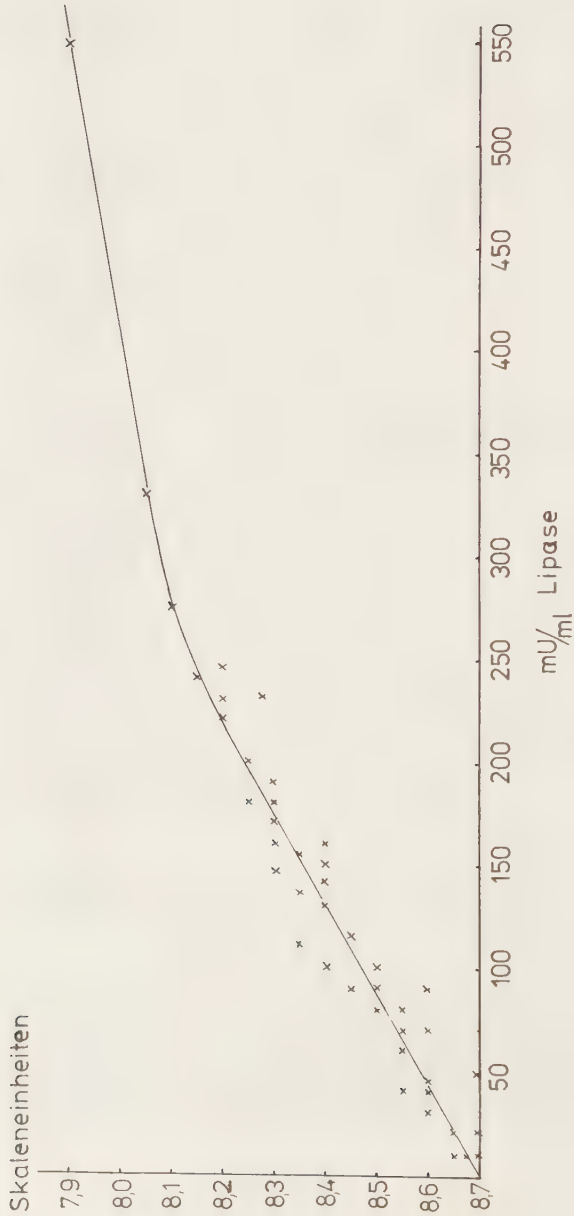


Abb. 16

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Lipasekonzentration

Die Lipaseaktivität einzelner Seren wurde jeweils durch die Lipasebestimmungsmethode nach RICK und durch den Lipaseschnelltest bestimmt. Der Schnelltest wurde immer bei pH 8,7 entsprechend 8,7 Skaleneinheiten auf der Farbskala gestartet.

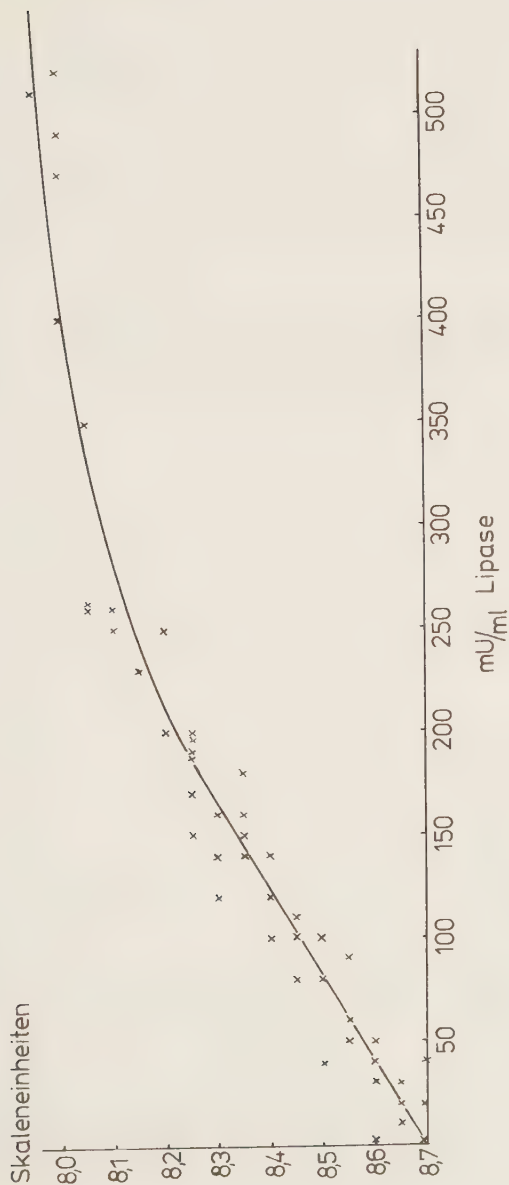


Abb. 17

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Lipasekonzentration

Die Lipaseaktivität einzelner Seren wurde jeweils durch die modifizierte Lipasebestimmungsmethode und durch den Lipaseschnelltest bestimmt. Der Schnelltest wurde immer bei pH 8,7 entsprechend 8,7 Skaleneinheiten auf der Farbskala gestartet.

RICK'schen Referenzmethode, so entsprechen 0,1 Skaleneinheiten zwischen 8,7 und 8,2 einer Lipaseaktivität von 43 U/l.

Benutzt man die modifizierte Weber-Methode als Referenz, dann ergibt sich eine Lipaseaktivität von 41 U/l pro 0,1 Skaleneinheiten (Abb. 17). Der lineare Bereich reicht auch hier von pH 8,8 bis 8,22.

Aus diesem Vergleich ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung aller drei Methoden. Als Bezugswert zur Farbskalakalibrierung habe ich abgerundet 40 U/l pro 0,1 Skaleneinheiten eingesetzt.

Trägt man die Testergebnisse der original WEBER'schen Methode gegen die des Schnelltests auf, so erhält man eine größere Streuung, da die Original-WEBER-Methode bereits eine große Streuung insbesondere im Normalbereich aufweist (s.S.89 f).

Skaleneinheiten

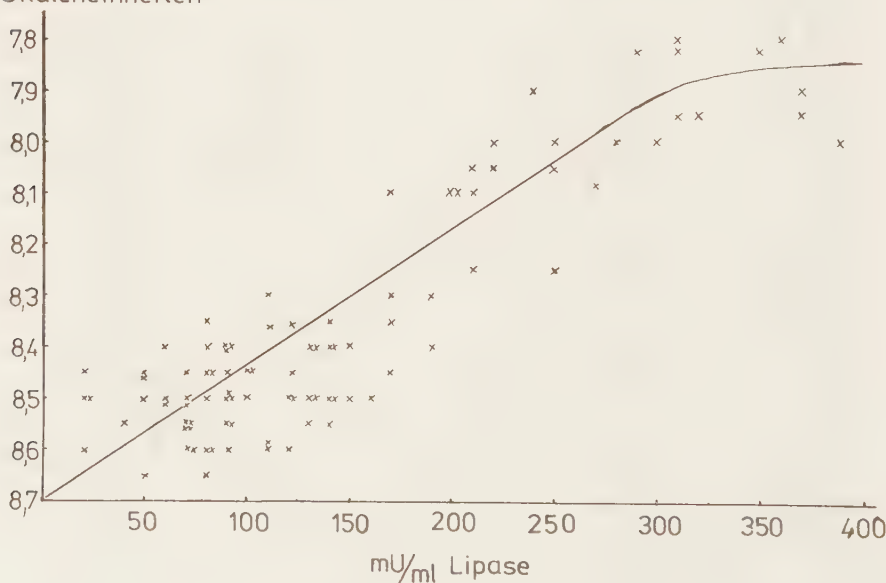


Abb. 18

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Lipasekonzentration

Die Lipaseaktivität einzelner Seren wurde jeweils durch die Lipasebestimmungsmethode nach WEBER (37°C) und durch den Lipaseschnelltest bestimmt. Der Schnelltest wurde immer bei pH 8,7 entsprechend 8,7 Skaleneinheiten auf der Farbskala gestartet.

8. Quantitative Messung des Indikatorumschlags:

Da die Farbbeurteilung von Farbskalen immer subjektiven Einflüssen unterliegt und so Ablesefehler das Testergebnis verfälschen können, wurde mit Hilfe eines Reflexometers versucht, den Indikatorumschlag objektiv darzustellen. Hierzu wurde ein flexibler Lichtleiter an ein EPPENDORF Photometer angeschlossen und auf eine rechteckige Glasküvette gerichtet, die den Testansatz enthielt. Der Lichtleiter wurde vor Fremdlicht geschützt im optimalen Abstand und Einfallswinkel vor der Küvette befestigt, so daß eine möglichst große Extinktionsdifferenz pro Skalenwert resultierte.

Bei 578 nm erreicht man bei einem Indikatorumschlag von Skaleneinheit 8,7 bis 8,2 eine Extinktionsdifferenz von 0,070, bei 546 nm von 0,064. Die Extinktionsänderung verläuft im Skalenabschnitt 8,7 bis 7,8 in Abhängigkeit von der Zeit linear. Ein Testansatz mit inaktiviertem Serum zeigt während der Inkubationszeit von 30 Minuten keine Extinktionsänderung.

Die geringe Extinktionsänderung vom Start des Testansatzes bis zum pathologischen Bereich hin schmälert die Anwendungsmöglichkeiten dieses Testverfahrens. Hinzu kommt noch, daß bei 546 und 578 nm zwischen Skalenwert 8,8 und 8,7 keine Extinktionsdifferenz festzustellen ist. Daher bereitet das Einstellen des Testansatzes auf das Start-pH mit dieser Vorrichtung Schwierigkeiten.

Eine bessere Meßeinrichtung könnte hier vielleicht weiterhelfen. Die lineare Extinktionsänderung des Indikatorumschlags erleichtert eine quantitative Aussage der Lipaseaktivität in jedem Inkubationszeitintervall.

Leistungsfähigkeit des Lipaseschnelltests als Suchtest in der Routine:

Eine semiquantitative Aussagekraft des Schnelltests kann man bis etwa 300 U/l Lipaseaktivität erwarten. Oberhalb dieser Grenzmarke sind die Testergebnisse nur noch in großen Stufen zu bewerten.

In der Routine interessiert die genaue Lipaseaktivität im Normalbereich nicht, da es diagnostisch bisher ohne Bedeutung

ist, ob die Lipaseaktivität 10, 50 oder 80 U/l beträgt.

Bei einer fraglichen Pankreopathie möchte der Kliniker die besonders bei chronischen Pankreaserkrankungen oftmals nur geringen Lipaseaktivitätserhöhungen erkennen. Aus diesem Grund sollte der Suchtest im Grenzbereich der Normalwerte recht zuverlässig arbeiten. Abb. 16 und 17 zeigen, daß von 13 Seren, die eine Lipaseaktivität von 140 bis 160 U/l enthalten, der Schnelltest bei 4 Seren mit 120 U/l eine zu geringe Lipaseaktivität ergab und ein Serum mit 180 U/l um 30 U/l zu hoch analysierte.

Möchte man den Schnelltest als Screeningtest einsetzen, der die Masse der normalen Seren von den pathologischen trennen soll, sind alle Seren, die eine höhere Aktivität als 140 U/l im Schnelltest aufweisen, einer nachfolgenden quantitativen Analyse zu unterziehen. Bei diesem Vorgehen erreicht der Schnelltest eine hohe Treffsicherheit aller grenzwertigen und leicht pathologischen Seren.

Für die Verlaufskontrolle und für Provokationstests möchte der Kliniker die genaue Aktivitätshöhe wissen, um eine während der Behandlung erkennbare abnehmende oder zunehmende Tendenz der Enzymaktivität in prognostischer Hinsicht bewerten zu können. Aus diesem Grund müssen alle Seren, die im Schnelltest eine höhere Lipaseaktivität als 140 U/l ergeben, nochmals durch aufwendigere Tests analysiert werden. Da semiquantitative Schnelltestergebnisse unter diesen Prämissen nicht ausreichen, wird man sich fragen, ob es sich lohnt den Schnelltest als Screeningtest vor die genaue Analyse des Serums zu schalten. Nach unserer Erfahrung müssen etwa 15 % aller Schnelltestbestimmungen mit einer quantitativen Methode wiederholt werden. Ob sich dieser zeitliche Aufwand an Doppelbestimmungen rentiert, hängt wesentlich von der täglichen Lipasebestimmungsrate des Labors ab. Bei mehr als 10 Bestimmungen pro Tag ist es angebracht, die auf Grund des Schnelltests ausgesonderten grenzwertigen und pathologischen Seren gesammelt und nur einmal wöchentlich oder zweimal mit einer quantitativen Methode genauer zu analysieren. Hierbei würde der Schnelltest den Lipasearbeitsplatz von der überwiegenden Menge der Seren

mit normaler Lipaseaktivität entlasten.

In der Notfalldiagnostik reicht der Schnelltest aus. Zur Differenzialdiagnose z.B. eines Herzinfarktes und einer akuten Pankreatitis ist es nur wichtig zu wissen, ob die Lipaseaktivität im Serum erhöht ist oder nicht. Diese Entscheidung kann schnell und sicher mit dem vorliegenden Schnelltest getroffen werden.

Schnell, weil bei einer akuten Pankreatitis mit Lipaseaktivitäten oberhalb von 700 U/l die hohe Enzymaktivität in wenigen Minuten und oberhalb von 1000 U/l in ein bis zwei Minuten an Hand des schnellen Farbumschlags erkannt werden können. Bei so hohen Aktivitäten ist es nicht nötig die volle Inkubationszeit von 30 Minuten abzuwarten.

Sicher, da oberhalb einer Serumlipaseaktivität von 200 U/l keine falsch negativen Schnelltestergebnisse zu erwarten sind und grenzwertige Lipasewerte bei diesen Notfällen diagnostisch nicht entscheidend sind.

Aus diesen Gründen ist die Notfalldiagnostik zum Ausschluß einer akuten Pankreatitis oder einer aktiven Begleitpankreatitis die Domäne dieses Lipaseschnelltests und sollte in keinem Intensivlabor fehlen.

Meßanordnung:

Es werden wahlweise: ein kalibriertes Farbband, selbst hergestellte Standards oder ein pH-Meter mit Einstabelektrode benötigt. Für diesen Test haben sich Reaktionsgefäße aus durchsichtigem Material, Einmalplastikröhrchen 50 x 15 mm, als besonders vorteilhaft erwiesen. Die Testansätze wurden mit handelsüblichen Plastikrührstäbchen gemischt.

Reagenzien:

Gummi arabisch, fein gepulvert (Merck 4282)

Oleum olivae neutralisat., sterilisat. (Siegfried)

m-Kresolpurpur (Merck 5228)

1 N Natronlauge

0,1 N Natronlauge

0,05 N Natronlauge

1 N Salzsäure

0,05 N Salzsäure

Lösungen:

Gummi arabicum Lösung 18 % (w/v)

45 g Gummi arabicum werden im Starmix auf Stufe 1 in 240 ml Aqua bidest. gelöst (etwa 15 Minuten). Diese Lösung ist bei +4°C aufbewahrt, mindestens 4 Wochen haltbar.

Oliveöl-Emulsion

Zu 50 ml 18 %iger Gummi arabicum Lösung gießt man 15 ml Oliveöl hinzu und homogenisiert diese Emulsion im Starmix fünf Minuten auf Stufe 2. Um den pH-Wert der Oliveöl-Emulsion lange Zeit konstant zu halten, ist es nötig, die in den emulgierten Öltröpfchen enthaltenen freien Fettsäuren zu neutralisieren. Dies erreicht man durch kurzzeitiges Alkalisieren des Homogenats auf etwa pH 11. Hierzu gibt man etwa 1,5 ml 1 N NaOH in die Emulsion und homogenisiert diese nochmals 2 Minuten auf Stufe 2. Nun stellt man die Oliveöl-Emulsion mit 1 N Salzsäure auf pH 5,5 bei 20°C ein. Diese Emulsion ist bei 4°C aufbewahrt mindestens 3 Monate haltbar. Sie muß vor Gebrauch geschüttelt werden.

0,008 N NaOH

8,0 ml 0,1 N NaOH in einem 100 ml-Meßkolben mit Aqua bidest. bis zur Marke auffüllen. Gut verschlossen nur beschränkt haltbar.

m-Kresolpurpur-Lösung 0,025 % (w/v)

25 mg m-Kresolpurpur in 100 ml 0,008 N NaOH lösen.

Die Indikatorlösung ist in einer randvoll gefüllten Flasche bei Zimmertemperatur aufbewahrt, mindestens ein halbes Jahr haltbar.

Endkonzentrationen im Test:

EV = 2,2 ml

0,105 ml Oliveöl/ml EV

63 mg Gummi arabicum/ml EV

0,12 mg m-Kresolpurpur/ml EV

Testansatz:

In den Test darf nur hämolysefreies Serum eingesetzt werden.

In ein Reaktionsgefäß pipettieren:	
Olivenölemulsion	1 ml
Indikatorlösung	1 ml
Serum	0,2 ml

gut mischen, bis der Testansatz in der Farbe homogen erscheint. Man vergleicht die Farbe des Testansatzes mit dem Farbband. Sie wird meistens zwischen dem Skalenwert 8,7 u. 8,6 liegen. Nun notiert man sich den abgelesenen Wert und läßt den Testansatz genau 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Nach der Inkubationszeit liest man den erreichten Farbwert des Testansatzes an Hand der Farbskala ab.

Sollte der Farbwert des Testansatzes nach der Serumzugabe zu violett oder zu hell sein, gibt man tropfenweise entweder 0,05 N HCl oder 0,05 N NaOH zum Testansatz, bis der Skalenwert 8,7 erreicht ist. Nach jeder Laugen- oder Säurezugabe muß der Testansatz gut durchgemischt werden.

Berechnung der Lipaseaktivität:

Die Lipaseaktivität in U/l = Differenz: Anfangsskalenwert
minus
Skalenwert nach 30
mal Faktor 40

Liegt der Skalenwert nach 30 min bei einem pH unter 8,2, dann ist die Lipaseaktivität höher als 210 U/l; genauere Angaben sind nicht möglich.

Besondere Hinweise:

Bei Lipaseaktivitäten über 1000 U/l kann man den Anfangsfarbtton nicht mehr fest einstellen, da der Indikator laufend im Farbtton verändert wird. In diesen Fällen läßt man den Testansatz mit einem Farbskalenwert von 8,8 bis 8,5 stehen. Schon nach wenigen Minuten wird der Skalenwert 8,0 erreicht.

Der pH-Wert des Ansatzes wird besonders bei bilirubinhaltigen Seren herabgesetzt.

Der Vergleich der Testansatzfarbe mit dem Farbband gelingt am besten, wenn man das Farbband direkt an das Reaktionsgefäß hält und den Farbtton seitlich durch die Gefäßwandung hin-

durch beurteilt.

Bei Serienbestimmungen kann man die benötigte Substrat-Indikatorlösung im Verhältnis 1:1 vorher über einem Magnetrührer mischen. Von dieser Mischung sind jeweils 2 ml in die Probengefäße zu pipettieren. Sie ist bei 4°C aufbewahrt 2 Tage haltbar, da nach dieser Zeitspanne der Indikator einen schmutzigen Farbton annimmt, der nicht mehr mit dem Farbband abgelesen werden kann.

Bei Einstellung aller Testansätze auf den Skalenwert 8,7 übrigst sich die Notierung des Anfangsfarbwertes. Nach diesem Vorgehen dauert die Einstellung eines Testansatzes nach etwas Übung etwa eine halbe Minute.

Es ist nicht notwendig die Probengefäße während der Inkubationszeit zu verschließen, da die CO₂- Absorption aus der Raumluft das Testergebnis nur niedriger Lipaseaktivitäten (unter 20 U/l) unwesentlich beeinflussen kann.

Läßt sich ausnahmsweise das Testergebnis nicht eindeutig als Grenzwert einstufen, läßt man die Testansätze nach der abgelaufenen 30 minütigen Inkubationszeit noch etwa weitere 10 Minuten stehen und vergleicht dann nochmals die kritischen Fälle mit der Farbskala. Während dieser 10 Minuten wandern grenzwertige Lipaseaktivitäten (160 U/l) um etwa 0,1 Skalenwert weiter. Das bedeutet, daß diese Seren bei einem Testansatzstart bei 8,7 den Farbskalenwert 8,3 deutlich überschritten haben sollten.

5.1.5. Einfluß des Hämoglobins auf die Serumlipaseaktivität:

In den Testansatz der Lipasebestimmungsmethode nach RICK wurden gleichzeitig zwei Seren hinzugegeben. Das eine Serum hatte eine Lipaseaktivität von 340 U/l, während das andere Serum vor der mechanischen Hämolyse nur eine Lipaseaktivität von 20 U/l und nach der Hämolyse eine Hämoglobinkonzentration von 640 mg/100 ml enthielt. Vom hämoglobinfreien Serum wurde jeweils 1 ml in den Ansatz gegeben. Das hämoglobinhaltige Serum wurde in ansteigenden Mengen zum Ansatz pipettiert, so daß Hämoglobinkonzentrationen von 0 bis 512 mg% erreicht wurden. Abb. 19 zeigt das Testergebnis. Die angegebene Hämoglobinkon-

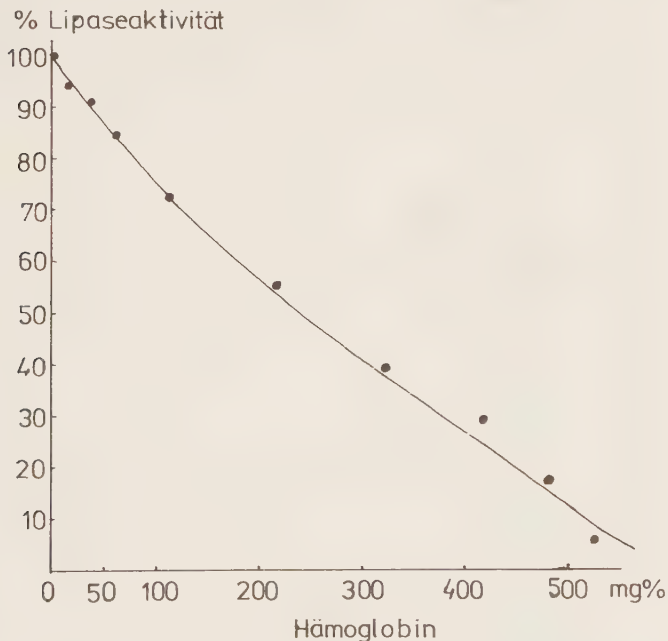


Abb. 19

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Serumhämoglobinkonzentration

In den Testansatz der Lipasebestimmung nach RICK wurde ein hämoglobinfreies Serum (340 U/l) und ein hämoglobinhaltiges Serum (20 U/l) in verschiedenen Mengen hinzugegeben. Die angegebenen Hämoglobinkonzentrationen beziehen sich auf das Serumendvolumen.

Tab. 2
Einfluß der Lipaseaktivität von der Serumhämoglobinkonzentration
Die genaue Testdurchführung ist im Text beschrieben

Hb-Konzentration im Serumendvolumen	Hb-freies Serum 340 U/l	Serumvolumen im Test Hb-haltiges Serum 20 U/l	Gesamtlipaseaktivität berechnet gefunden	Inhibierung in % v. d. berechneten Gesamtlipaseaktivität
0 mg/100 ml	1,0 ml	0,50 ml hämolysfrei	350 U/l	0 %
13	1,0	0,02	340	6
32	1,0	0,05	341	9
58	1,0	0,10	342	15
107	1,0	0,20	344	28
213	1,0	0,50	350	43
320	1,0	1,00	360	59
413	1,0	2,00	380	71
480	1,0	3,00	400	80
512	1,0	4,00	420	93

zentration bezieht sich auf die im Serumdendvolumen enthaltene Hämoglobinmenge.

Die Lipaseaktivität wird bei zunehmender Hämoglobinkonzentration immer mehr gehemmt. Ein Serumhämoglobingehalt von 70 mg% ist an der Rotfärbung des Serums schon deutlich sichtbar und mit einem etwa 20 %igem Lipaseaktivitätsverlust verbunden.

Aus diesem Grunde dürfen hämolytische Seren nicht zur Lipasebestimmung herangezogen werden, da je nach dem Hämolysegrad zu geringe Enzymaktivitäten gemessen werden.

Bei einer bestimmten Serumhämoglobinkonzentration fällt die Lipasehemmung bei geringerem Testendvolumen und konstanter Serummenge höher aus. Bei dem modifizierten Lipasetest ist sie geringer und beim Lipaseschnelltest ist sie höher anzusetzen als bei der RICK'schen Methode.

3.1.6. Einfluß des Heparins auf die Serumlipaseaktivität in vivo und in vitro:

Im Rahmen der klinischen Untersuchungen zur Höhe der Lipaseaktivität im Serum fiel auf, daß das Plasma heparinierter Patienten häufig pathologische Lipaseaktivitäten aufwies, obwohl keine Pankreasaffektion anzunehmen war.

Um diese unspezifischen Lipaseerhöhungen näher zu charakterisieren, wurde 13 gesunden Probanden vor einer Heparininjektion (10 IE/kg KG) und 10 Minuten danach Blut abgenommen und die Lipaseaktivität jeder Probe mit unserem Lipasetest bestimmt (74). Die Lipaseaktivitätserhöhung des Postheparinplasmas erreichte den doppelten bis zwanzigfachen Ausgangswert; durchschnittlich wurde der dreifache Wert vor der Heparininjektion gemessen (Tab. 3). Nur in einem Fall ließ sich keine Lipaseaktivitätserhöhung im Postheparinplasma feststellen.

Tab. 3

Lipaseaktivitätsbestimmung im Serum durch den modifizierten Lipasetest bei 13 gesunden Probanden vor und 10 min nach einer Heparininjektion (10 IE/kg KG)

Proband	vor Heparin	nach	<u>nach</u> <u>vor</u>
S	70 U/l	160 U/l	2,3
N	10	220	22,0
O	20	138	6,9
T	41	281	6,85
A	10	185	18,5
M	80	57	0,7
V	99	298	3,0
W	90	170	1,9
T	50	150	3,0
K	30	190	6,3
S	70	220	3,15
M	70	250	3,6
N	50	160	3,2

Ein Patient mit bekannter Pankreaserkrankung hatte schon vor der Heparininjektion eine deutlich erhöhte Lipaseaktivität (410 U/l), die sich im Postheparinplasma um 40 % erhöhte.

Beruht diese Lipaseaktivitätserhöhung im Postheparinplasma auf einer vermehrten Freisetzung der Pankreaslipase oder auf einer Aktivitätssteigerung eines anderen lipolytischen Serumenzyms, das durch Heparin in seiner Aktivität beeinflusst wird? Um zu prüfen, ob die gemessene Lipaseaktivitätserhöhung auf der Aktivitätszunahme der heparininduzierbaren Plasmalipoproteinlipase beruht (75), wurde folgende Versuchsreihe geplant:

Die Lipaseaktivität von vier Seren wird mit unserem Lipasetest vor und nach Heparininjektionen gemessen; dann wird in einen Testansatz Natriumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 1 Mol hinzugegeben, um die Lipoproteinlipase zu hemmen (74); in einem anderen Ansatz wird mit einer 0,2 molaren Natriumfluoridendkonzentration die Pankreaslipase inhibiert. Diese Testreihe wird mit und ohne Na-Glykocholat im Ansatz durchgeführt. Die Lipaseaktivität ohne Hemmstoffzusatz sollte die Summe der lipolytischen Aktivitäten der Lipoproteinlipase und der Pankreaslipase ergeben.

Leider konnte dieser Nachweis aus methodischen Gründen nicht erbracht werden. Natriumchlorid führt zur teilweisen Entmischung des Substrats und die Ablesung des Titrationsendpunktes ist dadurch unscharf. Bei den natriumfluoridhaltigen Tests wurden die titrierten Ansätze fortlaufend hydrolysiert, so daß ein Titrationsendpunkt nicht eindeutig festgelegt werden konnte.

Dann wurde der Einfluß des Heparins auf die Lipaseaktivität in vitro untersucht, da bekanntlich die Lipoproteinlipase durch Heparin in vitro nicht aktiviert wird.

Die lipolytische Aktivität zweier Seren wurde durch die RICK'sche Methode vor und nach Heparinzugabe in den Testansatz bestimmt. Dem einen Serum (50 U/l) wurden 2000 IE Heparin pro ml Serum hinzugegeben, wobei es 36 % seiner Aktivität verlor, während das andere Serum (290 U/l) nach Zugabe von 0,5 IE pro ml Serum 17 % und nach 1 IE Heparin pro ml Serum 26 % seiner lipolytischen Aktivität einbüßte. Weitere Heparinzugaben

zum letztgenannten Serum führten zu keiner weiteren Aktivitätsabnahme.

Wir können daher nur vermuten, daß die lipolytische Aktivitätszunahme des Postheparinplasmas durch eine aktivierte Lipoproteinlipase ausgelöst wird und, daß die Olivenölemulsion kein spezifisches Substrat der Pankreaslipase ist, sondern auch andere Serumlipasen dieses Substrat unter den für die Pankreaslipase gültigen Standardbedingungen zu hydrolysieren vermögen.

Weiter wurde geprüft, ob diese heparininduzierte lipolytische Aktivitätszunahme erhalten bleibt oder bei fortlaufender Heparininfusion nachläßt.

Als Probanden dienten 9 mit Heparindauerinfusion (ca. 300 IE/kg KG u. Tag) behandelte Herzinfarktpatienten, denen Blut vor der Infusion, 1, 2 und 24 Stunden nach Infusionsbeginn abgenommen wurde. Abb. 20 zeigt, daß die Lipaseaktivitäten aller Patienten vor der Infusion im Normalbereich lagen, während die Postheparinplasmen eine Stunde nach Infusionsbeginn eine wesentlich höhere lipolytische Aktivität aufwiesen, die indivi-

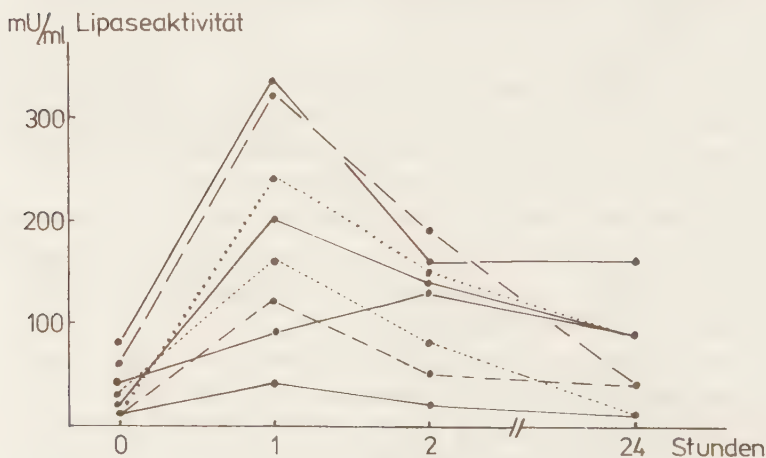


Abb. 20

Einfluß einer laufenden Heparininfusion auf die meßbare lipolytische Aktivität im Serum

Von 8 Herzinfarktpatienten wurde Blut vor der Infusion, 1, 2 und 24 Stunden nach Infusionsbeginn abgenommen und die Lipaseaktivität durch den modifizierte Lipasetest bestimmt.

duell verschieden hoch ausfiel und in der Regel in der zweiten Stunde wieder absinkt. 24 Stunden nach Infusionsbeginn lagen alle Werte wieder im Normalbereich. Bei einem Patienten trat postheparin nur eine geringe lipolytische Aktivitätszunahme auf.

Auf Grund dieser Beobachtungen dürfen Proben zur Lipaseaktivitätsbestimmung im Rahmen der Pankreasdiagnostik in den ersten 48 Stunden nach Beginn einer Heparintherapie nicht gewonnen werden.

3.2. Amylase

3.2.1. METHODENÜBERSICHT

Die α -Amylase hydrolysiert nichtterminale α 1,4 Glukosidbindungen hauptsächlich zu Maltose (70-90 %), kleinen Mengen Glukose und α -Grenzextrinen.

Die verschiedenen Nachweisverfahren zur Amylaseaktivitätsbestimmung beruhen auf:

1. Abnahme des Substrats

1.1. Messung der Jod-Stärke-Farbe

1.2. Liberierung farbstofftragender Endgruppen

2. Zunahme der Produkte

2.1. Messung der Reduktionsäquivalente

Diese Testverfahren können im einzelnen in vier Gruppen zusammengefaßt werden:

1. Messung der Abnahme der Jod-Stärke-Farbe (35,36,37,38,69)

Die Stärkefraktion Amylose ergibt mit Jod eine blaue Einschlußverbindung. Die Farbintensität dieser Einschlußverbindung ist abhängig vom Polymerisationsgrad des Polysaccharids. Bei Abnahme der Amylosekettenlänge nimmt die Extinktion der Lösung ab, wobei sich aber auch das Absorptionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen verschiebt. Auf Grund dieses Testprinzips kann die Amylaseaktivität nicht direkt in Internationalen Einheiten angegeben werden, da die Abnahme der Farbbintensität nicht unmittelbar mit der Zahl der gespaltenen Glukosidbindungen in Beziehung steht. Um dennoch die Meßergebnisse in Internationale Einheiten umrechnen zu können, müssen die jodometrischen Methoden an einer Methode geeicht werden, deren Ergebnis direkt in Internationale Einheiten ausgedrückt werden kann (27).

2. Messung der Zunahme hydrolysierter, farbiger Spaltprodukte eines Stärkepolymers (5,33,78,79,80,81,82,83)

Bei diesem Nachweisverfahren ist ein quervernetztes Polymerisat aus löslicher Stärke das Substrat der Amylase. An diesem Polymerisat sind Farbstoffgruppen kovalent gebunden. Bei der enzymatischen Hydrolyse werden lösliche, gefärbte Spaltprodukte frei, deren Konzentration nach Trennung vom unlöslichen

Substrat durch Zentrifugation oder Filtrierung photometrisch im Überstand oder Filtrat meßbar ist.

Da in den Polymerisaten das Verhältnis der Farbstoffgruppen zu den Glucosemonomeren von Charge zu Charge schwankt, muß jede Charge erneut an einer reduktometrischen Methode geeicht werden, um immer vergleichbare Amylaseaktivitäten, ausgedrückt in Internationale Einheiten, zu erhalten.

3. Messung der Zunahme hydrolysierter, reduzierender Hemiacetalendgruppen

Bei diesem Testprinzip werden die durch α -Amylase bei der Stärkehydrolyse neugebildeten reduzierenden Endgruppen mit verschiedenen Methoden nachgewiesen.

Die Zunahme der reduzierenden Endgruppen wird beispielsweise durch Reduktion von Kupferionen (4,9,37,38), von farblosem Triphenyltetrazoliumchlorid zu rotem Formazan (77) oder von 3,5-Dinitrosalicylsäure (76) gemessen.

Ein relativ neues Testverfahren (45) weist die durch α -Amylase aus Stärke abgespaltene Maltose im Rahmen eines UV-Tests nach. Die Maltose wird durch α -Glucosidase zu Glucose hydrolysiert und diese wiederum nach der bekannten Hexokinase-Methode im UV-Test bestimmt.

Mit jeder Spaltung einer α -1-4 Glucosidbindung werden reduzierende Hemiacetalgruppen frei, deren Zunahme nach den oben angegebenen Nachweisverfahren quantitativ gemessen werden können. Auf diese Weise kann bei diesen reduktometrischen Methoden die Enzymaktivität direkt in Internationale Einheiten angegeben werden, wenn man deren erweiterte Definition anwendet: Eine Einheit irgendeines Enzyms ist die Menge, welche die Umwandlung von 1 Mikromol Substrat pro Minute unter Standardbedingungen katalysiert. Wenn das Substrat nicht genau definiert ist, wie die Polysaccharide, tritt an die Stelle des Ausdrucks "1 Mikromol Substrat" der Ausdruck "1 Mikroäquivalent der reagierenden Gruppe" (22,28).

4. Messung der Amylaseaktivität durch einen kombinierten Enzymtest (84,85)

Die α -Amylase hydrolysiert als Endohydrolase die Amylose inner-

halb der Kette. Die Endohydrolase schafft so immer neue Endgruppen. Diese neugebildeten Endgruppen können nun mit Hilfe einer Exohydrolase abgebaut werden, wobei die Abbaugeschwindigkeit der Endgruppen von deren Anzahl abhängig ist. So ist die Geschwindigkeit der Exohydrolasereaktion ein direktes, quantitatives Maß für die Endohydrolaseaktivität. Als Exohydrolase wird eine aus Kartoffeln gewonnene Polysaccharid-phosphorylase verwendet, die niedermolekulare Kettenglieder vom nicht reduzierenden Molekülende her zu Glukose-1-phosphat abbaut. Glukose-1-phosphat wird über Glukose-6-phosphat in einer NADP abhängigen Reaktion nachgewiesen.

Dieser letztgenannte Amylasetest erlaubt eine kinetische Messung der Enzymaktivität. Die Exohydrolase ist jedoch noch nicht im Handel erhältlich.

Aus diesem Grunde habe ich mich auf die übrigen drei Testprinzipien beschränkt und folgende vier Methoden auf ihre klinische Anwendbarkeit vergleichend untersucht:

1. Die reduktometrische Methode von RICK und STEGBAUER (44,76) als Referenzmethode;
2. Die jodometrische Methode von STREET und CLOSE (35,36) als Merckotest α -Amylase (Art.-Nr. 3301) der Firma E. Merck Darmstadt im Handel;
3. Der Chromogentest: Phadebas Amylase Test der Firma Pharmacia AB in Uppsala Schweden (33);
4. Neben diesen drei quantitativen Amylasetests wurde ein jodometrischer Amylaseschnelltest auf seine semiquantitative Aussagekraft hin untersucht.

Um die Enzymaktivitätswerte dieser Methoden besser vergleichen zu können, habe ich bei allen Tests auf Empfehlung der Enzymkommission der IUB als Inkubationstemperatur 25°C gewählt.

Das Ziel war: Welche Methode eignet sich für das Routine-labor am besten?

Wobei neben Richtigkeit, Spezifität und Präzision auch Aufwand, Einsatz im Nachtdienst usw. mit berücksichtigt wurden.

3.2.2. REFERENZMETHODE

Die durch die Stärkehydrolyse der α -Amylase neugebildeten, reduzierenden Hemiacetalgruppen werden durch Reduktion der 3,5-Dinitrosalicylsäure zu Nitrosaminosalicylsäure photometrisch nachgewiesen.

Meßanordnung:

Die photometrische Messung erfolgte mit dem Eppendorf-Photometer bei 546 nm. Die Testansätze wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt und in einer Halbmikroküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Inkubation wurde im Wasserbad und die Farbreaktion mit Hilfe des Eppendorf-Thermostaten durchgeführt. Hierzu müssen die Reaktionsgefäße durch Auflegen einer schweren Platte am Öffnen gehindert werden.

Lösungen:

Phosphatpuffer 20 mM, pH = 6,9 (bei 25°C), 10 mM NaCl

Stärkelösung 1 % (w/v)

Zwei verschiedene Stärkepräparate wurden getestet:

a) lösliche Stärke p.a. (Merck 1252)

b) lösliche Stärke nach Zulkowsky p.a. (Merck 1257)

Die Stärkelösungen wurden nach Zugabe des Phosphatpuffers filtriert. Zuvor mußte der Phosphatpuffer zur Lösung der löslichen Stärke p.a. auf etwa 50°C im Wasserbad erhitzt werden.

Diese Stärkelösungen sind mindestens 8 Tage haltbar.

Puffer-Substrat-Gebrauchslösung

1 Teil Pufferlösung wird mit 1 Teil Stärkelösung über einem Magnetrührer gemischt.

Dinitrosalicylsäurereagenz (1 % (w/v) 3,5-Dinitrosalicylsäure, 30 % (w/v) Kalium-Natrium-Tartrat)

Das Dinitrosalicylsäurereagenz muß nach frühestens 24 Stunden von einem sich bildenden Bodensatz abfiltriert werden. Dieser Bodensatz bildet sich im Filtrat nach mehreren Tagen erneut und muß ebenfalls abfiltriert werden.

Endkonzentrationen im Test:

EV = 0,41 ml

20 mM Phosphat pH = 6,9 (bei 25°C)

10 mM Natriumchlorid

4,88 mg Stärke/ml EV

5,0 mg 3,5-Dinitrosalicylsäure im Ansatz

150 mg Kalium-Natrium-Tartrat im Ansatz

Testansatz:

Puffer-Substrat-Gebrauchslösung auf 25°C erwärmen.

In Reaktionsgefäße pipettieren:		
	Leerwert	Probe
Serum oder Harn	-	0,01 ml
Puffer-Substrat-Lösung	0,4 ml	0,4 ml
Reaktionsgefäße verschließen, 10 sec mischen und genau 10 min bei 25°C im Wasserbad inkubieren.		
Dinitrosalicylsäurereagenz	0,5 ml	0,5 ml
Serum oder Harn	0,01 ml	-
30 sec mischen und 8 min im Eppendorf-Thermostaten bei 95°C erhitzen. Im kalten Wasser abkühlen und nach frühestens 25 jedoch höchstens 150 min Extinktionen gegen Aqua bidest. messen.		

Bei der Serum- und seltener bei der Harnbestimmung bilden sich im Ansatz bei der Farbreaktion Proteinflöckchen. Pro Ansatz fällt immer nur ein Proteinflöckchen aus. Es stört die photometrische Messung empfindlich, wenn es sich in der Messlösung direkt in Höhe des Lichtstrahls befindet. Aus diesem Grund muß vor der photometrischen Messung darauf geachtet werden, daß das Proteinflöckchen entweder auf den Grund der Küvette sedimentiert, was meist schnell eintritt oder, daß man das schwebende Proteinflöckchen mit einem Holzstäbchen herausfischt. Diese Manipulationen kann man aber umgehen, wenn man alle Ansätze nach der Farbreaktion für 2 Minuten zentrifugiert.

Bei der Farbreaktion ist durch eine längere Erwärmungszeit als 8 Minuten keine höhere Extinktion der Ansätze zu erzielen. Bei der Extinktionsdifferenz von mehr als 1,5 muß der Harn oder das Serum 1:10 verdünnt und der Test wiederholt werden.

Berechnung der Amylaseaktivität:

Wie schon erwähnt, können die mit Hilfe dieses Tests gewonnen Enzymaktivitäten direkt in Internationale Einheiten angegeben werden. Da die Amylaseaktivität in Internationalen Einheiten definiert ist als die unter Standardbedingungen pro Minute freigesetzte Menge reduzierender Endgruppen, ist 1 μ m freigesetzter reduzierender Endgruppen 1 μ m Maltose äquivalent.

Zur Berechnung der Enzymaktivität muß eine Maltose-Eichkurve angelegt werden:

Hierzu wird in Reaktionsgefäße 0,020 - 0,200 ml ca. 2,5 mM Maltose-Standardlösung mit Aqua bidest. auf 0,210 ml aufgefüllt, der Leerwert wird mit 0,210 ml Aqua bidest. angesetzt. Zu jedem Ansatz werden 0,2 ml Substratlösung und 0,5 ml Dinitrosalicylsäurelösung hinzugegeben und 8 min bei 95°C erhitzt. Diese Ansätze werden wie oben beschrieben weiter behandelt.

Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Extinktionen werden gegen μ m Maltose pro Ansatz aufgetragen.

An Hand dieser Eichkurve ließ sich für die lösliche Stärke p.a. die Enzymaktivität wie folgt berechnen:

$$\text{Amylaseaktivität in U/l} \hat{=} \Delta E \times 5830$$

ΔE ist die Differenz zwischen der Extinktion der Probe und der des Leerwerts.

Mit löslicher Stärke nach Zulkowsky als Substrat erhält man einen höheren Faktor:

$$\text{Amylaseaktivität in U/l} \hat{=} \Delta E \times 7109$$

Es ist erstaunlich, daß die Maltose-Eichkurve einerseits mit löslicher Stärke p.a. und andererseits mit Zulkowskystärke als Substrat eine so verschiedene Steilheit ergeben. Vermutlich maskiert die Zulkowskystärke die Maltosereduktion in irgendeiner Weise. Bei allen Versuchsserien wurde immer das gleiche Kontrollserum mitgeführt. Die Amylaseaktivität dieses Kontrollserums schwankte bei Verwendung der Zulkowskystärke und des Faktors 7109 in den gleichen Grenzen wie die mit löslicher Stärke p.a. gemessenen Enzymaktivitäten.

Die Leerwertextinktionen schwanken in ihrer Höhe von Proband zu Proband erheblich. Dies beruht auf dem unterschiedlichen Gehalt reduzierender Substanzen - insbesondere der Glukose - in den zu untersuchenden Seren und Urinen.

Die Leerwertextinktionen ergeben mit löslicher Stärke gegen Aqua bidest. gemessen, etwa 0,25 - 0,4; mit löslicher Stärke nach Zulkowsky erhält man Extinktionen von etwa 0,15 - 0,3.

Die höheren Extinktionen der Ansätze mit löslicher Stärke p.a. sind durch deren vermehrten Gehalt an reduzierenden Endgruppen bedingt (86).

Da mit löslicher Stärke p.a. bei gleicher Amylaseaktivität etwa 20 % höhere Extinktionsänderungen in den Proben gemessen wurden als mit Zulkowskystärke, wurde überwiegend lösliche Stärke als Substrat in dieser Methode eingesetzt.

Abhängigkeit der Amylaseaktivität von der Inkubationstemperatur:

Da ich eine Inaktivierung der Lipase schon bei 37°C beobachtet habe, wurde nun auch der Einfluß der Inkubationstemperatur auf den Substratumsatz der Amylase untersucht. Als Substrat wurde lösliche Stärke p.a. und ein Urin mit einer Amylaseaktivität von 1000 U/l bei 25°C in den Test eingesetzt. Abb. 21 zeigt, daß bei 25°C nur 40 % der maximal möglichen Umsatzgeschwindigkeit der Amylase, gemessen wird. Bei 56°C sind nur noch 3 % der maximalen Enzymaktivität wiederzufinden.

Da das Temperaturoptimum bei 40°C liegt, ist bei 37°C noch nicht mit einer Enzymaktivierung zu rechnen.

Der Q_{10} -Wert zwischen 25 und 35°C beträgt bei der Amylase 2,0. Dieser ist sehr viel höher als bei der Lipase. Im Gegensatz zur Lipase muß bei der Messung der Amylaseaktivität bei 25°C statt bei 37°C ein etwa auf die Hälfte verminderter Substratumsatz hingenommen werden (Faktor 2,3).

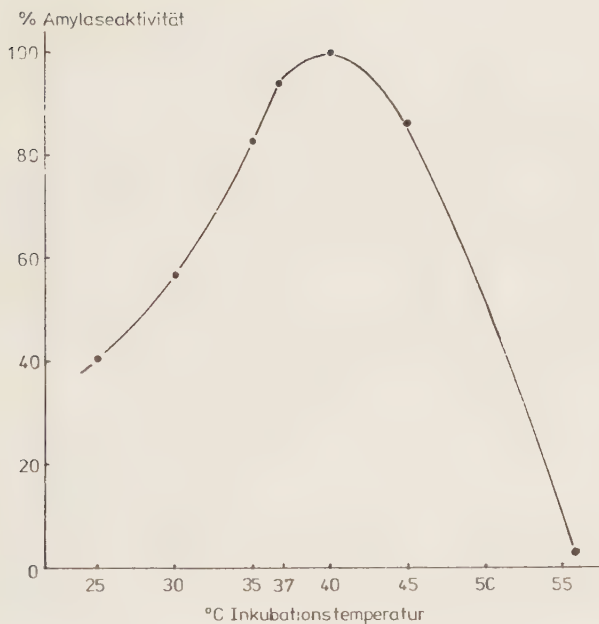


Abb. 21

Einfluß der Inkubationstemperatur auf den Substratumsatz

Die Amylaseaktivität eines Urins (1000 U/l) wurde bei verschiedenen Inkubationstemperaturen gemessen. Als Substrat diente lösliche Stärke p.a..

3.2.3. CHROMOGENMETHODE

Das Stärkesubstrat des Phadebas Amylase Test ist eine mit Diepoxid quervernetzte lösliche Stärke. An dieses wasserunlösliche Polymerisat werden im alkalischen Milieu blaue Farbstoffgruppen kovalent gebunden. Das Polymerisat weist eine Partikelgröße unterhalb 40 Mikron auf. Das blaue Stärkesubstrat wird mit Puffersalzen gemischt und zu Tabletten gepresst. Die enzymatische Hydrolyse setzt wasserlösliche Spaltprodukte der Stärke frei. Diese tragen Farbstoffgruppen, deren Konzentration photometrisch gemessen wird. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Natronlauge beendet.

(33)

Meßanordnung:

Die photometrische Messung erfolgte mit dem Eppendorf-Photometer bei 578 nm. Die Testansätze wurden in Zentrifugengläsern (100 x 16 mm) angesetzt. Die Überstände wurden in Normalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Zentrifuge mit mindestens 4000 U/min; ein auf 25°C temperiertes Wasserbad.

Lösungen:

Auf Grund der Originalangabe von CESKA (33) sollte eine Testtablette enthalten:

40 mg Stärkepolymerisat
20 mM Phosphatpuffer, pH = 7,0
50 mM NaCl
0,8 mg NaN_3
0,5 N NaOH

Es wurden zwei Chargen verwendet:

VL 1611

UM 8304

Endkonzentrationen im Test:

9,5 mg Stärkepolymer/ml EV (Serum)

9,8 mg Stärkepolymer/ml EV (Urin)

20 mM Phosphat pH = 7,0

EV = 4,2 ml (Serum)

EV = 4,1 ml (Urin)

50 mM NaCl
 0,8 mg NaN_3 im Ansatz
 1,0 ml 0,5 N NaOH im Ansatz

Testansatz:

Pro Bestimmungsserie werden zwei Leerwerte angesetzt.

In Zentrifugengläßser pipettieren:		
	Leerwert	Probe
Serum oder	-	0,2 ml
Urin	-	0,1 ml
Aqua bidest. (Serum)	4,2 ml	4,0 ml
(Urin)	4,1 ml	4,0 ml
schütteln und etwa 5 min bei 25°C im Wasserbad vorwärmen. In jeden Ansatz mit Hilfe einer Pinzette eine Testtablette hineinwerfen und kräftig schütteln, Stoppuhr starten und genau 30 min bei 25°C im Wasserbad inkubieren. Die Inkubation wird beendet mit		
0,5 N NaOH	1,0 ml	1,0 ml
schütteln und erst nach 15 min etwa 10 min zentrifugieren. Den klaren Überstand abpipettieren und dessen Extinktion bei 578 nm innerhalb von 60 min gegen Aqua bidest. messen.		

Bei Extinktionen über 0,55 wurden die Überstände 1 + 5 oder 1 + 10 mit Aqua bidest. verdünnt und die erhaltenen Extinktionen mit 6 oder 11 multipliziert.

Bei Extinktionen von mehr als 3,2 (traf zumindest für die beiden verwendeten Chargen zu) müssen die Ansätze mit einer kürzeren Inkubationszeit von 15 Minuten wiederholt werden. Bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten wäre das Meßergebnis mit dem Zeitfaktor 2 zu multiplizieren; dieses Vorgehen ist jedoch nur erlaubt, wenn die lineare Eichkurve durch den gemeinsamen Nullpunkt des Referenz- und Phadebas-Tests führt. Diese Prämisse gilt jedoch nur für die Urinuntersuchungen. Bei den Serumuntersuchungen muß man die Probe mit physiologischer Kochsalzlösung z.B. 1 + 1 verdünnen, erneut den Test durchführen und das Meßergebnis mit dem Verdünnungsfaktor 2 multiplizieren.

Seren mit erhöhten Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen dürfen nicht in den Test eingesetzt werden, da sie meistens zu

hohe Extinktionen ergeben und dadurch pathologische Serumamylaseaktivitäten vortäuschen.

Trübe Seren, die keine erhöhten Fettwerte aufweisen, können jedoch verwendet werden. Dies trifft auch für die Ansätze zu, die erst während der Inkubation trüb werden sollten. Diese Testergebnisse streuen im gleichen Bereich um die Regressionsgerade wie die der klaren Ansätze. Diese Trübungen dürfen aber wiederum nicht vom Stärkesubstrat verursacht sein. Kleinere Teilchen des Stärkesubstrats schwimmen auch nach der Zentrifugation noch in der Nähe der Wandung des Reaktionsgefäßes oder haften leicht an ihr. Aus diesem Grund müssen die zentrifugierten Ansätze möglichst erschütterungsfrei aus der Zentrifuge genommen und in Aufbewahrungsgestelle eingesetzt werden. Um diese nicht ganz vollständige Sedimentation des Stärkesubstrates dennoch so vollständig wie möglich zu erreichen, hat es sich bewährt, die Ansätze nach dem Durchmischen mit Natronlauge 15 Minuten ruhig stehen zu lassen und dann erst, ohne den Bodensatz aufzuwirbeln, zu zentrifugieren.

Einige Seren ergeben bei diesem Test auch nach mehrmaliger Kontrolle immer viel zu geringe Extinktionsdifferenzen (Abb. 37). Die hydrolytische Aktivität der Amylase muß bei diesen Seren durch irgendeine Serumeigene Substanz gehemmt werden oder die Seren weisen eine besonders niedrige Grundextinktion auf.

Der Überstand kann nach Zentrifugation mindestens 60 Minuten über dem Sediment bleiben, ohne daß während dieser Zeit eine Extinktionsänderung eintritt. Dies zeigt auch, daß die Enzymreaktion durch die Natronlauge vollständig gehemmt wird.

Aus technischen Gründen wurden die Extinktionen der Ansätze wie die der Jod-Stärke-Methode nicht bei 628 nm sondern bei 578 nm gemessen. Alle photometrischen Messungen wurden mit Eppendorf-Photometern ausgeführt. Mit den älteren Typen, die statt eines Photomultipliers noch eine Photozelle haben, reichte die Verstärkung des Gerätes nicht aus, um bei Wellenlänge 628 nm Messungen durchzuführen. Bei den Geräten mit Photomultipliern mußte ebenfalls bei hoher Verstärkung gearbeitet werden. Wegen der hohen Meßstromverstärkung ist der

Meßvorgang bei 623 nm sehr störanfällig. Es muß immer bei abgedunkeltem Meßraum gearbeitet werden, denn geringste Streulichtmengen beeinflussen die Meßgenauigkeit erheblich. Um diese nicht unwesentlichen Fehlerquellen auszuschalten, wurden alle Messungen bei 578 nm durchgeführt, obwohl hiermit geringere Extinktionsunterschiede gemessen werden, die aber nach meiner Ansicht nicht so gravierende Meßungenauigkeiten zur Folge haben, wie die durch zu hohe Verstärkung ausgelösten Meßfehler. Zum Vergleich wird der gleiche Ansatz abzüglich des Leerwerts bei 623 nm mit einer Extinktionsdifferenz von 0,293 und bei 578 nm mit 0,224 bestimmt.

Berechnung der Amylaseaktivität:

Um die durch die α -Amylase verursachten Extinktionsänderungen der Ansätze zu erhalten, muß von den gemessenen Extinktionen der Probenansätze der Mittelwert der Leerwertextinktionen abgezogen werden:

$$\Delta E = E_P - E_L$$

Diese Extinktionsdifferenz ist nur für eine bestimmte Charge ein Maß für die Enzymaktivität. So liegen zum Beispiel die Extinktionsdifferenzen der Charge VL 1611 um etwa 20 % höher als die der Charge 8304. So muß diese Methode in jedem Fall an einer anderen Methode geeicht werden, deren Meßergebnisse sich direkt in Internationale Einheiten angeben lassen.

Die Leerwertextinktionen sind wahrscheinlich durch Verunreinigung des Stärkesubstrats mit löslichen Farbstoffgruppen bedingt. Sie schwanken bei der Charge UM 8304 zwischen 0,011 und 0,024 und bei der Charge VL 1611 zwischen 0,019 und 0,045 Extinktionseinheiten.

Abhängigkeit der Amylaseaktivität von der Amylasekonzentration:

Es ist erforderlich, für Serum und Urinalysen jeweils eine gesonderte Eichkurve mit bekannten Proben aufzunehmen, wobei nur Humanserum oder Humanurin verwendet werden sollte, da Amylase verschiedener Provenienz auch eine unterschiedliche hydrolytische Aktivität gegenüber diesem Stärkesubstrat (33)

zeigt. Die Serum- und Urneichkurven zeigen einen unterschiedlichen Verlauf. Dies wird aber nur bei Verwendung verschiedener Serum- und Urinproben deutlich, deren Amylaseaktivität mit der Referenzmethode bestimmt wurde. Werden die Serum- und Urneichkurven mit Hilfe einer Verdünnungsreihe einer Probe aufgestellt, so weichen sie voneinander nur unwesentlich ab.

Eine Eichkurve, die durch Verdünnung einer Serumprobe unter Standardbedingungen aufgenommen wurde, zeigt Abb. 22. Vergleicht man diese Kurven mit jener von Abb. 37, so wird ersichtlich, daß die aus verschiedenen Serumproben gewonnene Regressionsgerade aus Abb. 37 die Ordinate bei einer Extinktion von 0,1 schneidet, während die Eichkurve der Serumverdünnungsreihe durch den Nullpunkt führt. Offenbar wird mit Phadebas ein Serumbestandteil mitgemessen, der nicht α -Amylase ist. Auch Abb. 24 zeigt, daß bei jedem Serum eine unterschiedliche Grundextinktion meßbar ist, die nicht mit der Amylaseaktivität des Serums im Zusammenhang steht und nur durch einen individuellen Probenleerwert eliminiert werden kann.

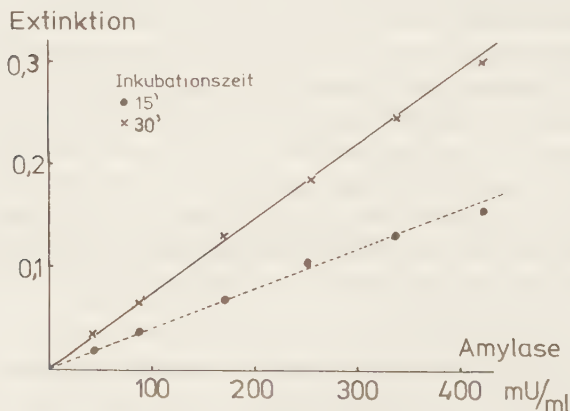


Abb. 22

Abhängigkeit der Amylaseaktivität von der Amylasekonzentration und der Inkubationszeit
Bestimmung der Amylaseaktivität einer Serumverdünnungsreihe (430 U/l) unter Standardtestbedingungen mit 15 und 30 minütiger Inkubationszeit. Substrat der Charge UM 8304.

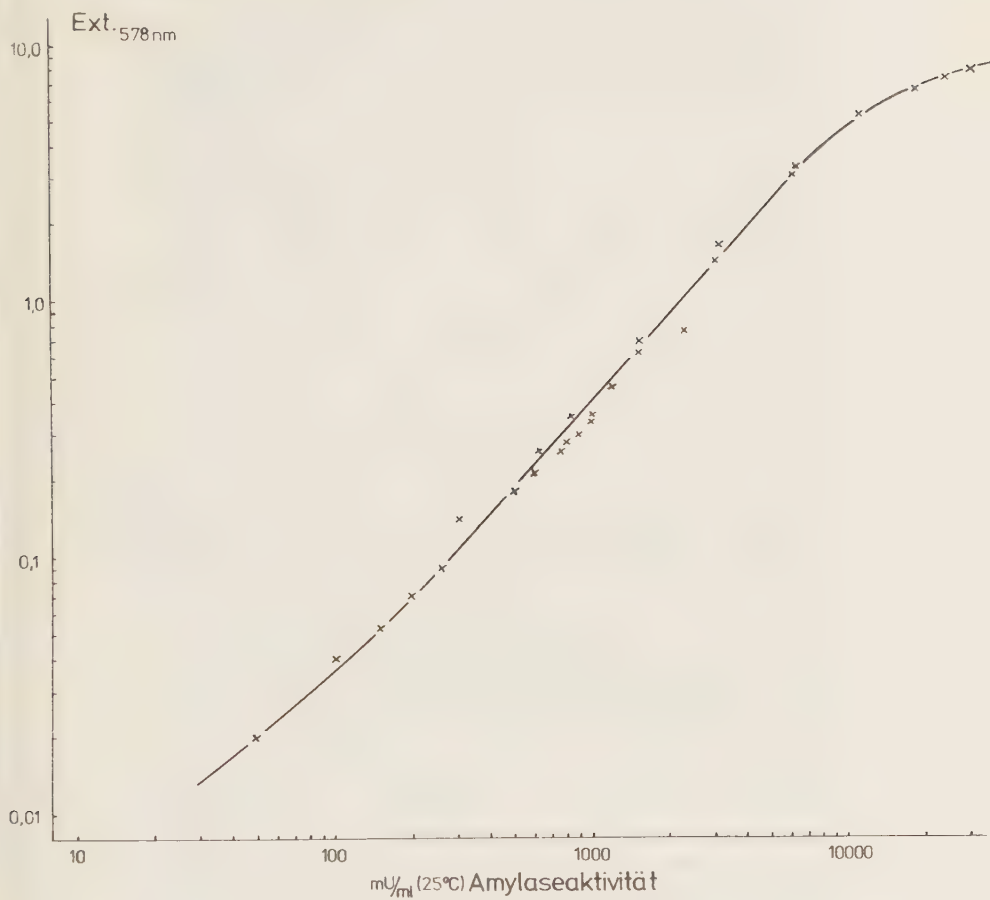


Abb. 23

Abhängigkeit der Urinamylaseaktivität von der Urinamylasekonzentration
Bestimmung der Amylaseaktivität verschiedener Urinproben (n=27) nach den Standardtestbedingungen unter Verwendung des Substrats der Charge UM 8304.

Dieser Probenleerwert variiert, gemessen gegen den Reagenzienleerwert, zwischen der Extinktion 0,02 und 0,13.

Abb. 23 zeigt die Abhängigkeit der Urinamylaseaktivität von der Urinamylasekonzentration, die nach der Referenzmethode bestimmt wurde. Diese Untersuchungen wurden mit dem Substrat der Charge UM 8304 und verschiedenen Urinproben durchgeführt. Mit dem Substrat dieser Charge läßt sich eine Eichkurve aufnehmen, die zwischen 170 und 7000 U/l Urin linear und jenseits dieser Grenzmarken flacher verläuft. Abb. 39 zeigt eine von der oben erwähnten Charge etwas abweichende Abhängigkeit der Urinamylaseaktivität von der Urinamylasekonzentration unter Verwendung des Substrats der Charge VL 1611. Die Eichkurve dieses Substrats schneidet die Extinktionsskala bei Null und verläuft von Beginn an linear.

Hieraus folgt, daß es bei den Urinamylasen nicht notwendig ist einen Probenleerwert mitzuführen, um eine vorhandene Grundextinktion bei der Ergebnisberechnung zu berücksichtigen.

Hingegen wird bei den Serumanalysen die zusätzliche Messung des Probenleerwerts eine wesentliche Verbesserung der Methode ergeben und die Amylaseaktivitätsbestimmung lipämischer Seren mit dieser Methode ermöglichen, da die Eliminierung der individuellen Grundextinktion in einer höheren Korrelation der Meßergebnisse dieser Methode gegen die Referenzmethode zum Ausdruck kommen wird. Dies ist schon auf Grund der größeren Streuung der Serumanalysen um die Regressionsgerade - im Gegensatz zu den Urinanalysen - zu erwarten. Der Streuungsgrad ist an dem unterschiedlichen mittleren Korrelationskoeffizienten dieser beiden Probenmaterialien erkennbar. Dieser beträgt für die Urinanalysen 0,927 und für die Serumanalysen 0,764.

Abhängigkeit der Amylaseaktivität von der Inkubationszeit:

Die Inkubationstemperatur wurde aus den Eingangs erwähnten Überlegungen von 37 auf 25°C gesenkt. Da man hierdurch eine geringere Enzymaktivität erhält, mußte geprüft werden, ob man diese Änderung der Testbedingungen nicht durch eine annehmbare Ausdehnung der Inkubationszeit ausgleichen kann.

Durch Verlängerung der Inkubationszeit von 15 auf 30 min kann man diesen Enzymaktivitätsverlust beinahe kompensieren (Abb. 22). Abb. 24 zeigt den linearen Verlauf der Zeit-Umsatzkurve einer Serumprobe (450 U/l) über die gesamte Inkubationszeit von 30 min.

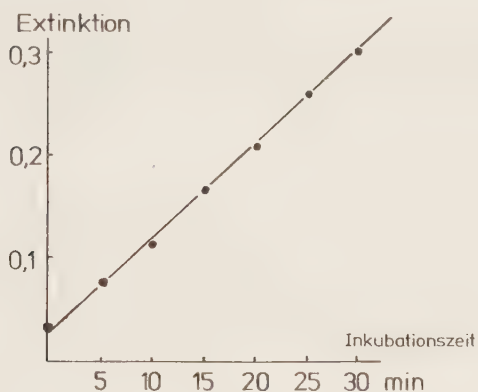


Abb. 24

Abhängigkeit der Amylaseaktivität von der Inkubationszeit

Bestimmung der Serumamylaseaktivität (450 U/l) unter Standardtestbedingungen.

3.2.4. JODOMETRISCHE METHODE

Amylose wird durch die hydrolytische Aktivität der Amylase zu Dextrinen und kleineren Zuckereinheiten abgebaut. Diese Hydrolyseprodukte ergeben je nach ihrem Polymerisationsgrad mit Jod Einschlußverbindungen von blauer, roter und gelber Farbe bis hin zur Farblosigkeit. Die Jod-Stärke-Reaktion ist der Indikator für den Substratabbau. Das Maß der Amylaseaktivität ist das Verhältnis der photometrisch gemessenen Farbintensität der blauen Einschlußverbindungen eines Leewerts zu der Probe.

Meßanordnung:

Die photometrische Messung erfolgte mit dem Eppendorf-Photometer bei 578 nm. Die Testansätze wurden in Reagenzgläsern (22 x 160 mm) angesetzt und in Normalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Inkubiert wurde in einem 25°C warmen Wasserbad.

Lösungen:

Es wurden die Reagenzien des Merckotest α -Amylase Testpacks (Art.-Nr. 3301) der Firma E. Merck Darmstadt verwendet.

Puffer-Substrat-Lösung (0,2 g/100 ml Amylose, 15 mM NaCl, 20 mM Phosphatpuffer pH = 7,1)

Es ist darauf zu achten, daß das Amylosekonzentrat keine Trübungen oder Niederschläge enthält. Die notwendige Tagesmenge aus dem Vorratsgefäß ausgießen. Die Lösung ist, bei 4°C aufbewahrt, etwa 3 Monate haltbar. Das Substrat ist unbrauchbar, wenn die Extinktion des Leewerts, gemessen gegen Aqua bidest., unter 0,40 absinkt.

Farbreagenz (0,008 N Jodlösung)

In Glasflaschen im Dunkeln aufbewahrt mindestens zwei Jahre haltbar.

Farbreagenzgebrauchslösung

Farbreagenz wird mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:20 gemischt.

Endkonzentrationen im Test:

EV = 1,01 ml

0,198 mg Amylose/ml EV

20 mM Phosphat pH = 7,1

15 mM Natriumchlorid

0,51 mg Jod im Ansatz

Testansatz:

Pro Bestimmungsserie werden zwei Leerwerte angesetzt. Die Urine müssen zuvor 1 + 1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden.

In Reagenzgläser pipettieren:		
	Leerwert	Probe
Puffer-Substrat-Lsg.	1,0 ml	1,0 ml
etwa 5 min bei 25°C im Wasserbad vorwärmen		
Serum oder 1+1 verd. Urin	—	0,01 ml
sorgfältig mischen, Stoppuhr starten und die URINproben 10 min die SERUMproben 15 min bei 25°C im Wasserbad inkubieren		
Farbreagenz-Gebr.-Lsg.	10,0 ml	10,0 ml
mischen und Extinktionen der Ansätze innerhalb von 30 min gegen Aqua bidest. messen.		

Färbt sich die Probe nach Zusatz des Farbreagenzes nicht blau sondern blauviolett oder ist die Extinktion der Probe bei Serumanalysen geringer als 0,35 bzw. bei Urinanalysen geringer als 0,39, so muß die Bestimmung nach Verdünnen der Probe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 4 oder 1 + 9 wiederholt und das Testergebnis mit 5 bzw. 10 multipliziert werden.

Die Leerwertextinktion liegt meistens zwischen 0,450 und 0,435.

Die photometrische Messung dieses Tests ist aus den gleichen Gründen, wie schon bei der Chromogenmethode dargelegt, nicht beim Extinktionsmaximum von 620 nm sondern bei 578 nm durchgeführt worden. Bei 578 nm und im Bereich von 10 SCE werden etwa 17 % niedrigere Extinktionsdifferenzen gemessen als bei 623 nm.

Berechnung der Amylaseaktivität:

Eine Probe hat eine Amylaseaktivität von 100 Einheiten pro 100 ml, wenn 0,01 ml dieser Probe 0,2 mg Amylose unter Standardbedingungen komplett hydrolysiert.

Die Amylaseaktivität wird in STREET-CLOSE-Einheiten pro 100 ml (SCE) angegeben. Bei dieser Definition der Enzymeinheiten wird vorausgesetzt, daß, wenn alle Amylose hydrolysiert wurde, Jodzugabe in den Ansatz keine Färbung mehr ergibt.

Serum:

$$\text{Amylaseaktivität in SCE} = \frac{E_L - E_P}{E_L} \times 100$$

$$\text{Urin: Amylaseaktivität in SCE} = \frac{E_L - E_P}{E_L} \times 200$$

Abhängigkeit der Amylaseaktivität von der Amylasekonzentration:

Bei den Serumanalysen konkurriert das Serumweiß und in geringerem Maße auch die Fette mit der Amylose um das Jod. Hieraus resultiert, gemessen gegen den Reagenzienleerwert eine amyloseunabhängige Grundextinktion, die etwa 5 SCE entspricht. (Abb. 36). Die Zugabe von 10 μ l Serum mit einem Gesamteiweißgehalt von 6,8 g/100 ml erniedrigt die Leerwertextinktion um etwa 0,01. Bei einer angenommenen Leerwertextinktion von 0,440 entspricht dies einer vorgetäuschten Enzymaktivität von 2,3 SCE. Seren mit erhöhtem Eiweißgehalt (über 8,0 g/100 ml) beeinflussen das Meßergebnis in der oben beschriebenen Weise so sehr, daß sogar pathologische Amylaseaktivitäten fälschlicherweise gemessen werden. Abb. 36 zeigt die verhältnismäßig große Streuung der Meßergebnisse um die Regressionsgerade, die bestimmt zu einem großen Teil von dem individuellen Eiweißgehalt der Seren beeinflusst wird. Auch bei dieser Methode wird die Einführung eines Probenleerwertes die Richtigkeit der Testergebnisse verbessern helfen. Abb. 25 zeigt die Abhängigkeit der mit dieser Methode gemessenen Amylaseaktivitäten unverdünnter Urinproben gegen die durch die Referenzmethode bestimmten Amylasekonzentrationen. Die Eichkurven verlaufen von Beginn an immer steiler. Diese Kurvenverläufe lassen sich einer-

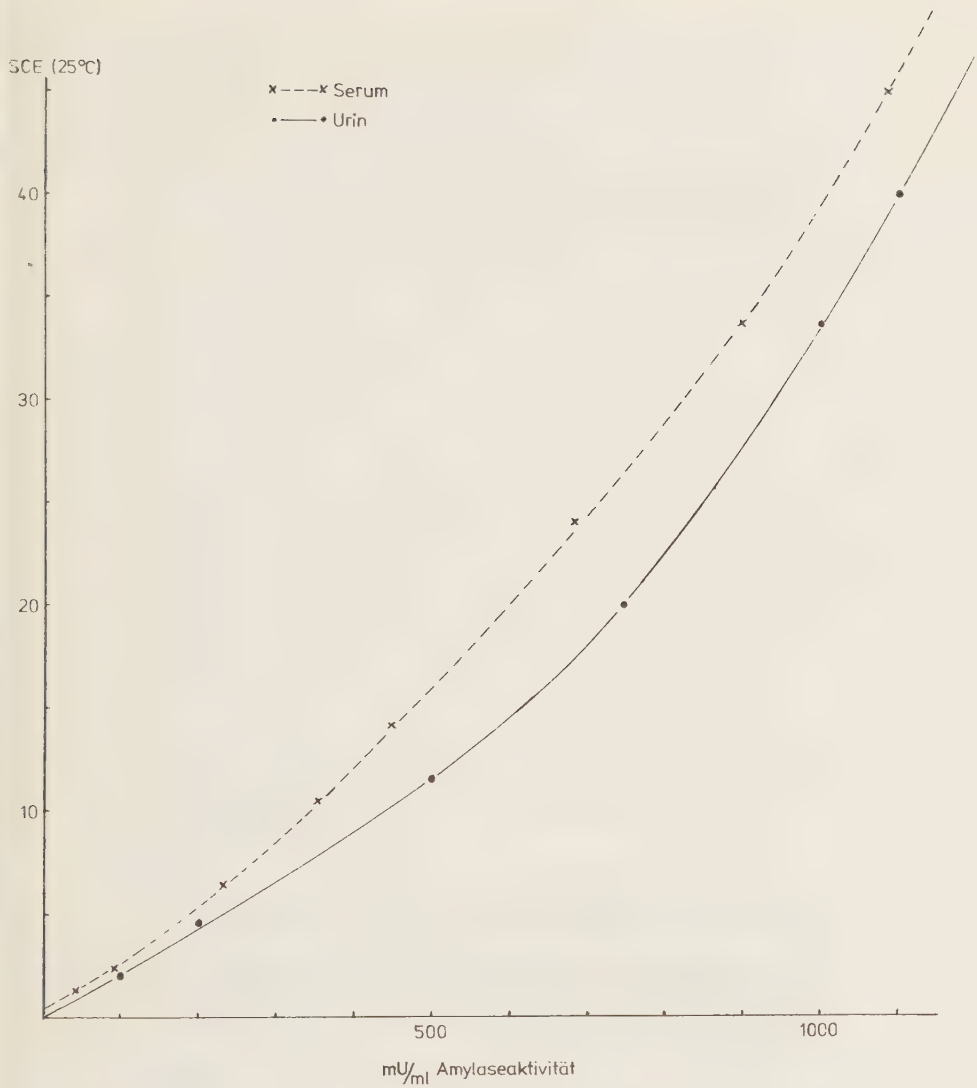


Abb. 25

Abhängigkeit der Amylaseaktivität in Serum- und Urinproben von deren Amylasekonzentration

Die Amylaseaktivität unverdünnter Serum- und 1:1 verdünnter Urinproben wurden nach dem Standardtest gemessen. Die Amylasekonzentration der Proben wurde durch die Referenzmethode bestimmt.

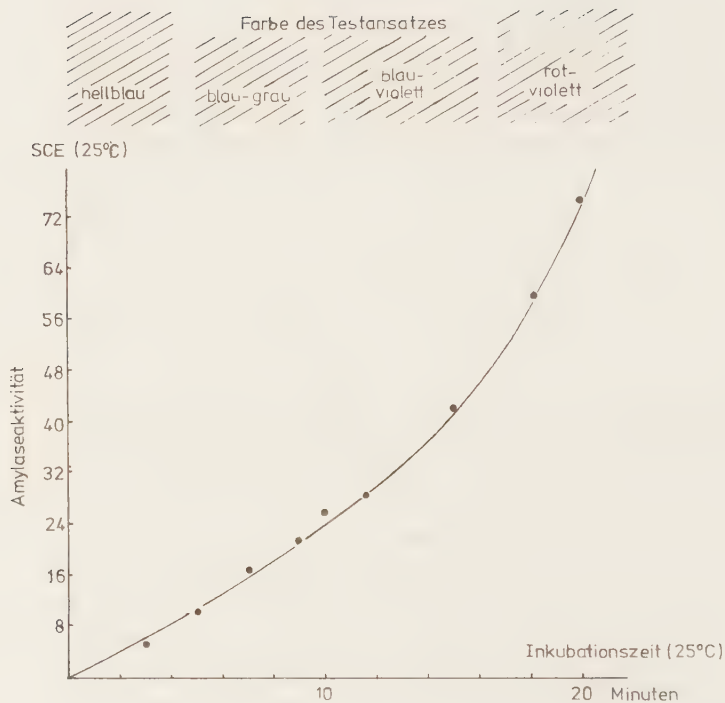


Abb. 26

Abhängigkeit der Amylaseaktivität von der Inkubationszeit

Die Amylaseaktivität einer Urinprobe (720 U/l) wurde nach dem Standardtest bestimmt. Beachte die den jeweiligen Enzymaktivitätsbereichen entsprechenden Farben des Testansatzes.

seits auf Grund der zu geringen Substratsättigung der Amylase und andererseits durch Verschiebung des Extinktionsmaximums der farbigen Proben zu kürzeren Wellenlängen hin interpretieren.

Vergleicht man die Substratendkonzentrationen der Amylasetests miteinander, so erhält man bei diesem Test eine fünf- undzwanzigmal geringere Substratendkonzentration als bei der Referenzmethode. Auch Abb. 26 läßt daran zweifeln, ob bei dieser Methode die Amylaseaktivität während der gesamten Inkubationszeit bei Substratsättigung gemessen wird.

Mit zunehmender Amylaseaktivität wird die Kettenlänge der Amylose immer mehr gekürzt, so daß ein kontinuierlicher Farbwechsel der Probe resultiert (Abb. 26). Da sich die Extinktionsmaxima der verschiedenen Farben der Ansätze zu immer kürzeren Wellenlängen verschieben, wirkt dieser Einfluß auf die Meßergebnisse im Sinne einer Abflachung der Eichkurven.

Bei den Serum- und Urinanalysen ist es möglich, den Bereich von 0 bis 20 SCE als linear anzusehen, ohne eine wesentliche Einbuße an Meßgenauigkeit (etwa $\pm 1,5$ SCE) hinnehmen zu müssen. Jenseits dieser Grenzmarke von 20 SCE muß jedoch die Probe verdünnt werden, um nicht fälschlicherweise zu hohe Enzymaktivitäten zu erhalten. Diese Grenzmarke, von der ab die Probe verdünnt werden muß, ist schon an der Farbe der Probe leicht erkennbar, da sich von nun an eine violette Farbe der blau-grauen Farbe beimischt.

Legt man den Normalbereich der Serumamylase ($\bar{x} + 2s$) auf 14 SCE fest, so kann man auf Grund dieser Prämisse die Serumamylaseaktivität bis in den pathologischen Aktivitätsbereich ohne vorige Verdünnung messen, während dies bei den Urinanalysen unter den angegebenen Testbedingungen leider nicht möglich ist. Bei den Urinanalysen muß schon im oberen Normalbereich weiterverdünnt werden. Die Reduktion der Inkubationstemperatur von 37°C auf 25°C bedeutet bei den Serumanalysen eine Ausweitung des meßbaren Aktivitätsbereichs ohne Probenverdünnung, hat aber bei Beibehaltung der Inkubationszeit von 15 min eine Verminderung der Trennschärfe der Testergebnisse zur Folge. Bei den Urinanalysen wurde ein Kompromiß gesucht, der einerseits die hohe Verdünnung der Originalme-

thode von 1:10 reduziert und andererseits eine annehmbare Trennschärfe der Meßwerte liefert (je höher die Verdünnung, um so gravierender die Pipettierfehler). Durch Reduzierung der Inkubationszeit auf 10 min und der Probenverdünnung auf 1 + 1 glaube ich einen guten Mittelweg in Hinsicht auf die Trennschärfe der Testergebnisse und einer einfachen Durchführbarkeit der Probenverdünnung gefunden zu haben.

Auf Grund der kürzeren Inkubationszeit bei Urin gegen Serum erwartet man eine zunehmende Abweichung der Urin- und Serum-eichkurven bei höherer α -Amylasekonzentration. Wie Abb. 25 zeigt, nähern sich beide Kurven oberhalb 16 SCE wieder. Weiter ist zu bemerken, daß Urinproben, deren Amylasekonzentration denen von Seren entsprechen, schon weiter verdünnt werden müssen, wenn sie unterhalb von 0,39 Extinktionseinheiten liegen statt wie bei den Seren erst ab 0,35 Extinktionseinheiten.

Ist dieses unterschiedliche Verhalten der Serum- und Urinproben bei der Amylaseaktivitätsbestimmung mit Amylose als Substrat ein Indiz für deren unterschiedliches Isoenzymmuster, auf daß bereits in der Einleitung auf Seite 2 hingewiesen wurde?

KAMARYT (53) hat festgestellt, daß sich im Serum und Harn zwei Amylasefraktionen befinden, deren relative Aktivitäten im Serum und Harn unterschiedlich sind. Nimmt man also an, daß eine der beiden Isoamylasen eine höhere Affinität zur Amylose aufweist und zwar diejenige, die eine höhere relative Aktivität im Urin haben soll, so müßte eine Abhängigkeit der Amylaseaktivität der Urinproben gegen deren Amylasekonzentration resultieren, so wie sie in Abb. 25 gezeigt wird.

3.2.5. SCHNELLMETHODE

Dieser Schnelltest beruht auf dem gleichen Testprinzip wie die jodometrische Methode.

Meßanordnung:

Die Ablesung der Testergebnisse wird visuell vorgenommen, wobei sich die Verwendung einer hellen Leuchtstoffröhre als Lichtquelle bewährt hat. Die Tests wurden in Reagenzgläsern (z.B. 22 x 160 mm) durchgeführt. Inkubiert wird in einem 25°C warmen Wasserbad.

Lösungen:

Bei dieser Methode wurde der gleiche Reagenzienpack Merckotest a-Amylase (Art.-Nr. 3301) wie bei der quantitativen jodometrischen Methode verwendet.

Ergänzend hierzu ist zu vermerken, daß

1. die Puffersubstratlösung für diesen Test schon dann nicht mehr verwendet werden sollte, wenn der Leerwert gemessen gegen Aqua bidest. niedriger liegt als 0,43 Extinktionseinheiten,
2. die Farbreagenzgebrauchslösung wird nicht benötigt.

Endkonzentrationen im Test:

EV = 1,1 ml

0,182 mg Amylose/ml EV

20 mM Phosphat pH = 7,1

15 mM Natriumchlorid

0,51 mg Jod im Ansatz

Testansatz:

Bei diesen hier angegebenen Testbedingungen ist es nicht notwendig die Urinproben zu verdünnen. Auf der anderen Seite mußten wiederum für Serum- und Urinanalysen zwei Inkubationszeiten gewählt werden.

Es dürfen nur klare Urinproben in den Test eingesetzt werden.

In Reagenzgläser pipettieren:	
	Probe
Puffer-Substrat-Lösung	1,0 ml
etwa 5 min bei 25°C im Wasserbad vorwärmen	
Serum oder Urin	0,1 ml
sorgfältig mischen, Stoppuhr starten und die URINproben 90 sec SERUMproben 240 sec bei 25°C im Wasserbad inkubieren	
Farbreagenz	0,5 ml
mischen und nach 3 - 4 min die Farbe der Probe beurteilen.	

Bei der Beurteilung der Probenfarbe hat es sich bewährt, die Reagenzgläser direkt vor die Leuchtstoffröhre zu halten.

Auf Grund der großen Enzymmengen im Test ist es notwendig, die Inkubationszeit genau einzuhalten.

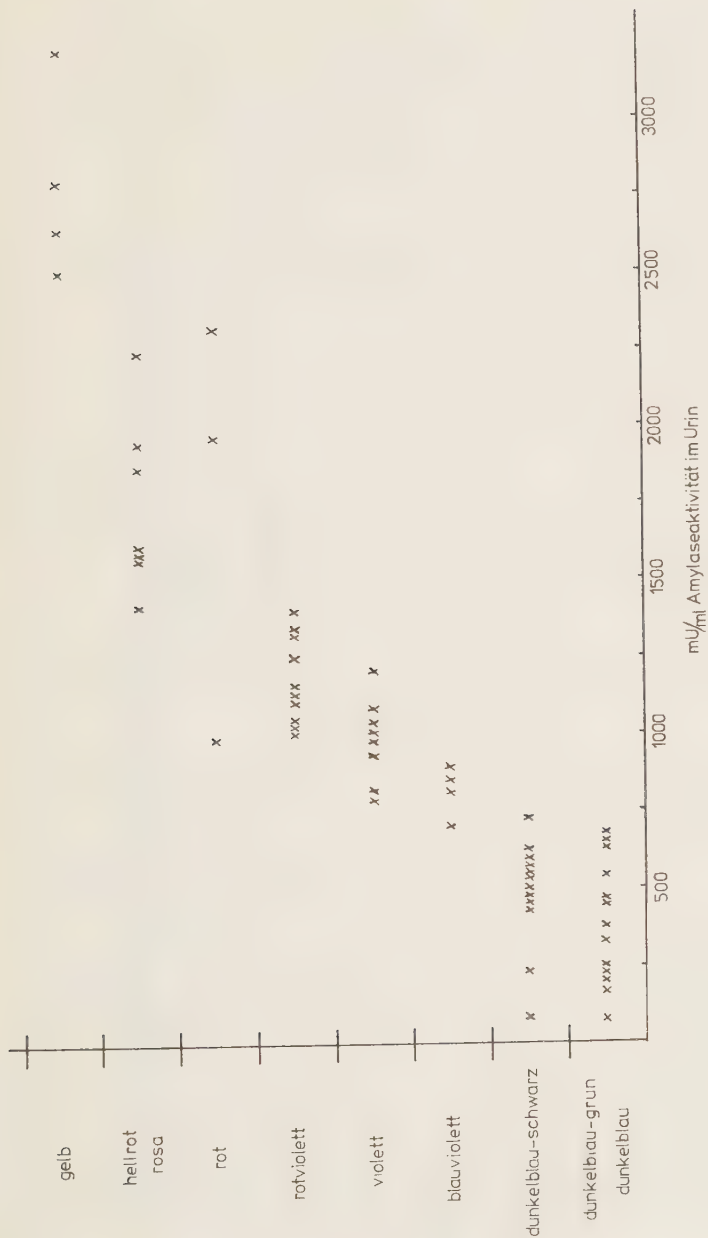
Bereitet es einmal Schwierigkeiten die Farbe der Probe in die richtige Farbkategorie einzuordnen, so stelle man sich einen Reagenzienleerwert her (1,0 ml Puffer-Substrat-Lsg. und 0,5 ml Farbreagenz), der rein dunkel ist und keinen violetten Farbton enthält.

Es ist darauf zu achten, daß manche Proben sich nach der Ablesezeit weiter entfärben, so daß dann leicht einmal pathologische Enzymaktivitäten vorgetäuscht werden.

Semiquantitative Auswertung:

Die Inkubationszeiten und die in den Test eingesetzten Probenmengen wurden so bemessen, daß im Grenzbereich der Amylaseaktivitäten von Serum- und Urinproben ein möglichst gut zu beurteilender Farbumschlag der Probe eintritt. Abb. 27 u. 28 zeigen die Abhängigkeit der Probenfärbung von der Amylasekonzentration.

Die Amylasekonzentrationen der Proben wurden mit der Referenzmethode bestimmt. Die Bewertung der einzelnen Farbabstufungen ist aus Tab. 4 zu entnehmen.



mU₇₀ Amylaseaktivität im Urin

Abb. 27

Amylaseschnelltest

Färbung der Urinansätze nach einer Inkubationszeit von 90 s und einer Ableszeit von 3-4 min nach Jodzugabe.



Abb. 28

Amylaseschnelltest

Färbung der Serumansätze nach einer Inkubationszeit von 240 s und einer Ablesezeit von 3-4 min nach Jodzugabe.

Tab. 4

Semiquantitative Auswertung der Probenfärbung

Die Amylasekonzentrationen der Proben wurden mit der Referenzmethode bestimmt

SERUMANALYSEN

Farbe der Probe	Amylaseaktivitätsbereich	in U/l
dunkelblau-grün blau	normal	< 350
blau-schwarz schwarz		350-520
	grenzwertig	
schwarz-violett blau-violett		450-600
rot-braun braun		600-800
	pathologisch	
gelb		> 800

URINANALYSEN

dunkelblau-grün dunkelblau dunkelblau-schwarz blau-violett	normal	< 900
violett rot-violett	grenzwertig	900-1400
rot hellrot		1400-2400
	pathologisch	
gelb		> 2400

Bei den Serumanalysen (n = 34) ist eine gute Abstufung der Farbwerte in Abhängigkeit von der Amylasekonzentration in

der Probe erreicht worden. Das Auftreten der violetten Farbkomponente zeigt den Beginn des pathologischen Bereichs sicher an. Obwohl relativ hohe Serumeiweißmengen in den Test eingesetzt wurden, war keine grobe Abweichung des Testergebnisses vom erwarteten Wert zu beobachten gewesen. Bei den Urinanalysen ($n = 61$) lag dagegen einmal eine größere Abweichung des Testergebnisses vom erwarteten Wert vor. Dieses falsch positive Testergebnis ist ebenso wie der breitere Amylasekonzentrationsbereich pro Farbabstufung auf die im Urin individuell enthaltenen organischen Substanzen zurückzuführen, die mit der Amylose um das Jod konkurrieren und deren Anfärbung abschwächen. Die Bindung von Jod an organische Urinbestandteile ist an der veränderten Farbe des Probenansatzes zu erkennen. Die Farbe sieht heller bzw. reiner aus und verändert sich nach der Inkubationszeit, noch vor der Ablesezeit, sehr schnell in Richtung auf die rote bis gelbe Farbabstufung. Ein Eiweißgehalt des Urins bis mindestens 50 mg/100 ml hat keinen Einfluß auf das Meßergebnis. Auf Grund dieser potenziellen Fehlerquellen ist unbedingt darauf zu achten, daß nur klare Urine in den Test eingesetzt werden; am besten man zentrifugiert den Urin kurz und entfernt die Probenmenge vom klaren Überstand. Alle Urinanalysen habe ich deshalb mit zentrifugierten Urinen durchgeführt. Bei den Urinproben zeigt erst der violette bis rotviolette Farbton den Beginn des pathologischen Enzymaktivitätsbereichs an.

Dieser Amylaseschnelltest zeichnet sich bei Beachtung der oben erwähnten Fehlerquellen, durch seine hohe Zuverlässigkeit aus. Er eignet sich nicht nur für die Schnelldiagnostik sondern auch als Screeningtest, um aus der Vielzahl der im Normalbereich liegenden Amylaseaktivitätsbestimmungen die grenzwertigen und pathologischen Proben herauszufinden und einer weiteren quantitativen Untersuchung zuzuführen.

4. Zuverlässigkeit und Qualitätskontrolle der angewandten Methoden

4.1. Herstellung des Kontrollserums:

Die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag wurde unter Verwendung eines Kontrollserums bestimmt.

Dieses Kontrollserum wurde wie folgt selbst hergestellt: während zwei Wochen wurden die Serumreste, von denen entweder die Lipase- oder Amylaseaktivitäten bekannt waren, gesammelt und gefroren aufbewahrt. Um ein Kontrollserum mit einer Lipase- und Amylaseaktivität im Grenzbereich zu erhalten, wurden die Seren nicht wahllos in einen Serumpool gegeben, da ich die Streuung der Methode im Grenzbereich bzw. im unteren pathologischen Bereich für diagnostisch interessanter halte, als die im Normal- oder hoch pathologischen Bereich.

Der gefrorene Serumpool wurde aufgetaut und zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand in ein Gefäß gegeben. Aus diesem wurde unter laufendem Umrühren Serum portioniert in Kunststoffgefäße abgefüllt und gefroren bei -24°C aufbewahrt.

Die Haltbarkeit eines auf diese Weise hergestellten und aufbewahrten Kontrollserums beträgt, auf die Amylase- und Lipaseaktivität bezogen, mindestens zwei Jahre.

Das Testserum, wie auch alle anderen Serumproben, wurden eingefroren nur einmal aufgetaut, obwohl dreimaliges Auftauen die Lipaseaktivität nicht verändert.

4.2. Präzision der Methoden in der Serie:

4.2.1. Lipase

Bei der RICK'schen Methode erhält man beim Kontrollserum und hoch pathologischen Serum etwa gleiche Variationskoeffizienten (Tab. 5).

Dagegen resultiert beim modifizierten Lipasetest beim Pankreatisserum ein deutlich geringerer Variationskoeffizient als beim Kontrollserum.

Die beinahe identischen Standardabweichungen dieser beiden Seren weisen darauf hin, daß die Fehlerquelle des modifizierten

Tab. 5

Präzision der Methoden in der Serie

Alle diese Untersuchungen wurden mit dem gleichen Kontrollserum durchgeführt. Ausnahmen siehe Anmerkungen.

Lipase im Serum						
Methode	Inkubations- temperatur °C	Anzahl d. Unters.	Mittelwert Ext. U/l	Standardabweichung Ext. 1 s U/l	VK %	Bemerkungen
RICK	25	12	331	21	6,3	
		9	2990	177	5,9	2) 3)
modifizierte	25	12	284	21	7,4	1)
		10	563	24	2,8	2) 4)
WEBER	37	9	178	26	14,8	
Amylase im Serum						
RICK u. STEGDAUER	25	10	451	19	4,2	
CHROMOGEN	25	10	0,321	0,0047	1,5	Charge UM 8304
		10	0,339	0,0093	2,35	5)
		10	0,378		2,7	
STIMMET u. CLOSE	25	10	0,378	0,0042	4,2	5)
		12	14,0 SCE	0,61 SCE	1,1	Charge VL 1611
			442		4,4	
				32	7,3	5)

Anmerkung: 1) Leerwertansatz vor Inkubation; 2) Pankreatitiss Serum; 5) 100 yi Serum im Ansatz;

4) Leerwertansatz nach Inkubation; 5) Umrechnungsformeln siehe auf Seite 99

Qualitätskontrolle der Methoden von Tag zu Tag

Bei allen Methoden wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und das gleiche Kontrollserum verwendet.

Phase in Serum		Methode	Inkubations- temperatur °C	Anzahl d. Tage	Mittelwert		Standardabweichung		VK	Kontrollgrenzen		Bemerkungen
					Ext.	U/l	Ext.	1 s		U/l	%	
		RICK	25	42	320		23	7,2	366		274	6)
		modifizierte	25	57	281		24	8,5	329		233	1)
		WEBER	37	26	184		45	24,45	274		94	
mylase im Serum												
		RICK u. STEGBAUER	25	20	451		20	4,4	491		411	Charge UM 8304
		CHROMOGEN	25	17	0,299		0,0073	2,4			409	5)
					445		18	4,1	481			Charge VL 1611
				11	0,361		0,0120	3,3				
		STREET u. CLOSE	25	22	14,3 SCE		0,46 SCE	3,2	15,2		13,4 SCE	
					458		24	5,3	506		410	5)

Anmerkungen: 1) - 5) s. Tab. 5; 6) werden statt 1 ml Serum nur 0,5 bzw. 0,2 ml Serum in den Ansatz gegeben, erhöht sich der Variationskoeffizient auf 7,3 bzw. 7,7 %.

Lipasetests hauptsächlich bei der Erkennung des richtigen Titrationsendpunktes liegt.

Bei den Kontrollserumanalysen wurde schon vor der Inkubation Serum in die Leerwertansätze pipettiert, so daß 14 % geringere Enzymaktivitäten gemessen wurden als im Standardtestverfahren (s.S. 25). Der dadurch bedingte niedrigere Mittelwert der Kontrollserumanalysen unserer Methode gegenüber der Methode von RICK erhöht den Variationskoeffizienten bei ähnlich hoher Standardabweichung. Unter Standardtestbedingungen durchgeführte Analysen werden so einen Variationskoeffizienten in der Nähe der RICK'schen Methode erreichen. Mit der WEBER'schen Methode erhält man den schlechtesten Variationskoeffizienten des Kontrollserums.

4.2.2. Amylase

Obwohl bei der jodometrischen Amylasemethode Testpackungen von drei Chargen verwendet wurden, variierten die Mittelwerte der Kontrollseren nicht über 7,3 %.

Bei der Amylasereferenzmethode sind lösliche Stärke p.a. und Stärke nach Zulkowsky nebeneinander verwendet worden, ohne daß die Kontrollserumergebnisse von einander abwichen.

Die Testergebnisse der Präzision in der Serie sind in Tab. 5 dargelegt.

Auf die Bestimmung der Präzision von Urinanalysen in der Serie wurde verzichtet. Zur Qualitätskontrolle der Urinuntersuchungen wurde kein Kontrollurin mitgeführt, sondern das Kontrollserum diente auch hier zur Sicherung von Richtigkeit und Präzision der Analysen.

4.3. Qualitätskontrolle der Methoden von Tag zu Tag:

Die Ergebnisse der Qualitätskontrollen von Tag zu Tag sind graphisch in den Kontrollkarten (Abb. 29 - 34) dargelegt und in Tab. 6 näher erleutert.

Pro Untersuchungsserie wurden meistens zwei Testserumansätze mitgeführt. Bei den Amylasebestimmungen ist das Kontrollserumergebnis der Mittelwert aller an diesem Tag durchgeführten Analysen.

Die WEBER'sche und die modifizierte Lipasemethode waren in

der Routine eingesetzt, daher konnten in der Kontrollkarte fortlaufende Kalendertage eingetragen werden. Mit Einschränkung trifft dies auch für die Amylase-Chromogenmethode zu. Bei den übrigen Methoden liegen zwischen den einzelnen Kontrollpunkten manchmal längere Pausen. Dies hat zur Folge, daß es schwieriger ist die Testbedingungen konstant zu halten.

Um die Ergebnisse der Qualitätskontrolle und die der Präzision in der Serie besser vergleichen zu können, habe ich bei den beiden Amylasemethoden, deren Ergebnisse nicht direkt in Internationale Einheiten angegeben werden können, die Extinktionswerte bzw. SCE mit Hilfe der auf Seite 99 angegebenen Umrechnungsformeln in Internationale Einheiten umgerechnet.

Unter den Amylasemethoden ist die Präzision der jodometrischen Methode am schlechtesten. Eine Fehlerquelle ist das geringe Probenvolumen, das in die hohen Reagenzgläser nicht immer so genau hineinpipettiert werden kann. Bei der Referenzmethode wird auch ein Probenvolumen von nur 0,01 ml eingesetzt, das aber zuverlässiger in kleine Reaktionsgefäße eingebracht werden kann.

Bei der Qualitätskontrolle von Tag zu Tag wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt und deren Mittelwerte in den folgenden Abbildungen und der Tabelle eingesetzt. In den Kontrollkarten wurden der besseren Übersicht halber nur die obere und untere Warngrenze eingetragen ($\bar{x} \pm 2s$).

Abb. 29 - 34 zeigen, daß die Lipasemethoden gegenüber den Amylasemethoden deutlich an Präzision unterlegen sind. Die WEBER'sche Lipasemethode schneidet mit einem Variationskoeffizienten von etwa 24 % bei der Qualitätskontrolle von Tag zu Tag und von etwa 19 % bei der Bestimmung in der Serie besonders schlecht ab. Diese Methode wurde bisher in der Routine benutzt und als diagnostisch nicht zuverlässig genug eingestuft.



Abb. 29
Kontrollkarte der Lipasemethode von RICK

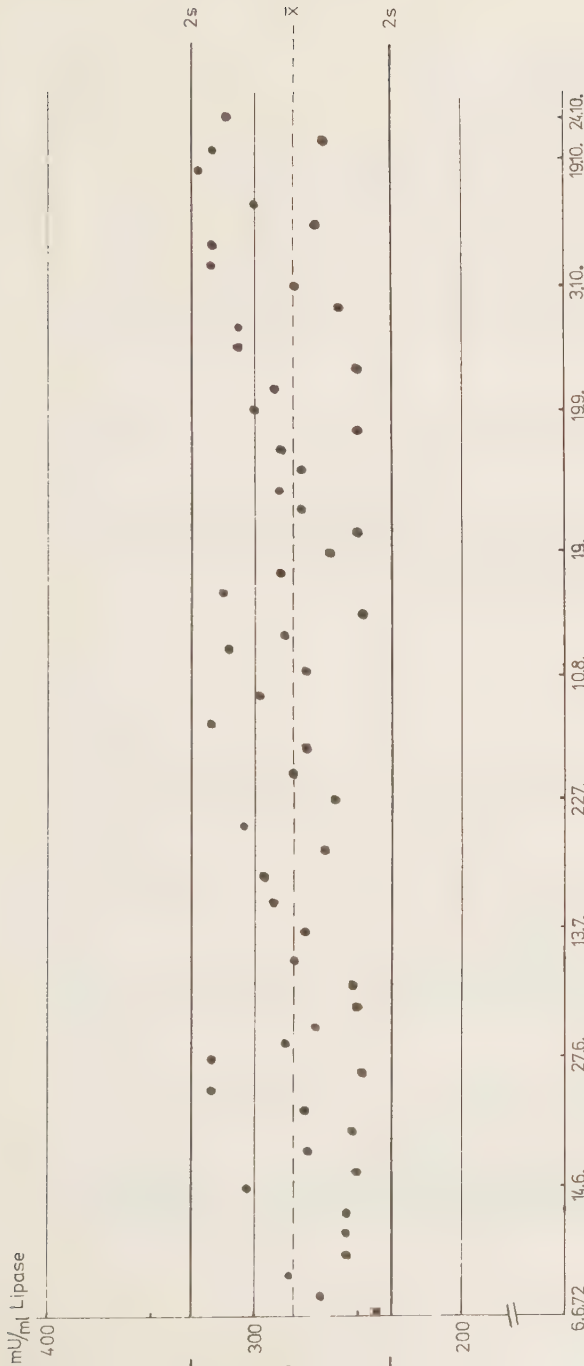


Abb. 30
Kontrollkarte der modifizierten Lipasemethode

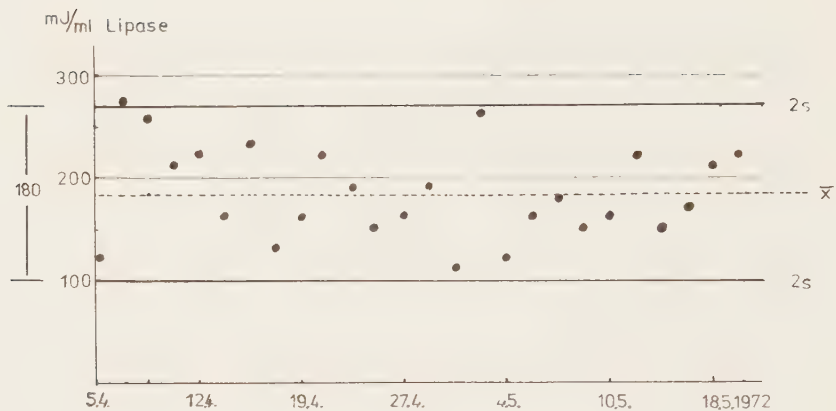


Abb. 31

Kontrollkarte der Lipasemethode von WEBER
(Inkubationstemperatur von 37°C)

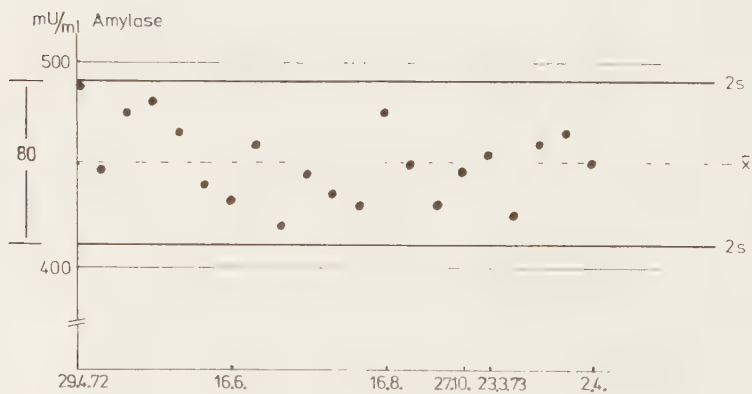


Abb. 32

Kontrollkarte der Amylasemethode von RICK u. STEGBAUER

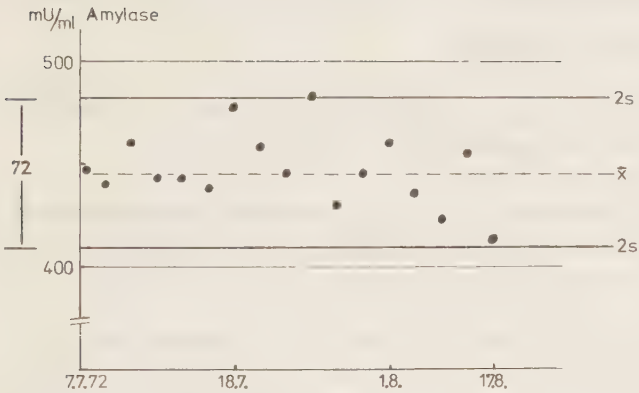


Abb. 33

Kontrollkarte der Amylasemethode nach dem Chromogenprinzip
(Charge UM 8304)

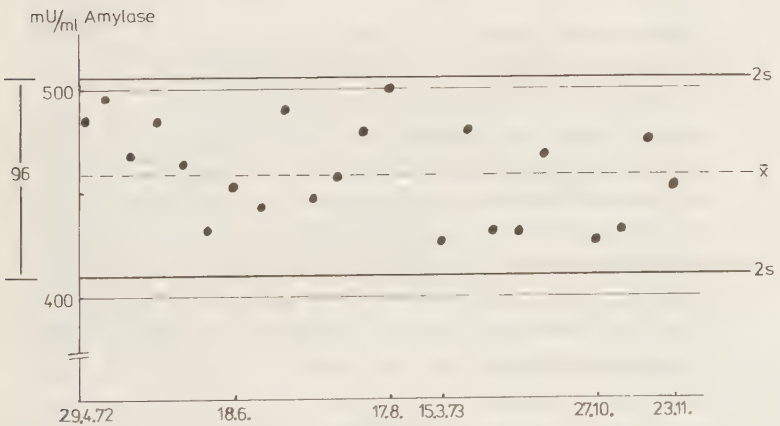


Abb. 34

Kontrollkarte der Amylasemethode von STREET u. CLOSE

5. METHODENVERGLEICH

5.1. Statistische Aussagen:

Die in dem nun folgenden Abschnitt angegebenen statistischen Angaben sind durch Berechnungen des Zahlenmaterials der Normalkollektive gewonnen worden (Abb. 42 - 49).

Es wurden die RICK'sche und die verbesserte Lipasemethode und die Amylasemethoden von RICK u. STEGBAUER, die Chromogenmethode und die Methode von STREET u. CLOSE verglichen. Bei den Amylasemethoden wurden Serum- und Urinuntersuchungen durchgeführt.

Es ist hervorzuheben, daß jeweils alle Serumanalysen einerseits und alle Urinuntersuchungen andererseits mit identischem Probenmaterial durchgeführt wurden. Dieses Vorgehen sollte beim Methodenvergleich alle Beeinflussungen der Meßergebnisse von seiten der individuellen Zusammensetzung der Proben eliminieren.

Streute die Enzymaktivität einer Probe von Methode zu Methode zu sehr, so wurden diese Messungen wiederholt.

Als Maß der Meßwertstreuung um die Regressionsgerade wurden in Tab. 7 die gemeinsamen Korrelationskoeffizienten aller Altersgruppen angegeben. Ebenso wird hier die Streubreite der Testergebnisse ($2s$) um die Regressionsgerade und die Gleichungen der Regressionsgeraden aufgeführt.

Um die Meßwerte der Amylasemethoden, deren Testergebnisse nicht direkt in Internationale Einheiten angegeben werden können, besser vergleichen zu können, wurden deren Ergebnisse mit Hilfe der folgenden Umrechnungsformeln in Internationale Einheiten umgerechnet. Diese Umrechnungsformeln leiten sich direkt von den Regressionsgeraden ab, die bei der Korrelation der Referenzmethode mit der jodometrischen oder Chromogenmethode erhalten wurden.

Umrechnungsformeln der Amylaseaktivität gemessen als Extinktion oder SCE in U/l:

Serum:

PHADEBAS Charge UM 8304

$$\text{Amylaseaktivität in U/l} = 2500 \cdot E - 303$$

STREET u. CLOSE

$$\begin{aligned}\text{Amylaseaktivität in U/l} &= 53 \cdot \text{SCE} - 300 \\ &= 14286 \cdot E_{(L-A)} - 320\end{aligned}$$

Urin:

PHADEBAS Charge VL 1611

$$\text{Amylaseaktivität in U/l} = 2816 \cdot E - 29$$

STREET u. CLOSE

$$\begin{aligned}\text{Amylaseaktivität in U/l} &= 36 \cdot \text{SCE} - 83 \\ &= 17200 \cdot E_{(L-A)} - 109\end{aligned}$$

Ergebnisse:

Alle Tests zeigen eine signifikante, lineare Abhängigkeit an, da bei 250 Freiheitsgraden die 5 % Signifikanzgrenze schon ab einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,124$ liegt.

Aus Tab. 7 kann man entnehmen, daß die jodometrische sowie die Chromogenmethode bei beiden Urinalysen eine bessere Übereinstimmung der Meßwerte gegenüber der Referenzmethode zeigen als bei den Serumanalysen. Dies ist, wie schon im methodischen Teil erwähnt, auf die individuellen Analysenleerwertextinktionen der Seren zurückzuführen, die im Standardtest nicht berücksichtigt werden.

Folgt man der Interpretation des Korrelationskoeffizienten nach HANSERT (97), so zeigt keine der beiden Serumamylasemethoden eine gute lineare Abhängigkeit gegenüber der Referenzmethode; denn nach HANSERT deutet ein r -Wert unter 0,80 eine schlechte Streuung der Meßwerte um die Regressionsgerade bei linearer Abhängigkeit an.

Methodenvergleich

Diese Korrelationen wurden mit den nichttransformierten Meßwerten des Normalkollektivs berechnet.

x	Korrelationen y	Gleichung der Regressionsgeraden	Gemeinsamer Korrela- tionskoeffizient	2 s U/l	Gruppenumfang
SERUM (Amylase)					
RICK u. STEGBAUER (U/l) - STREET u. CLOSE (SCE)	$y = 5,66 + 0,0188 \cdot x$		0,803	138	254
- STREET u. CLOSE (E·10)	$y = 0,2244 + 0,0007 \cdot x$		0,784	151	254
- PHADEBAS UM 8304 (E)	$y = 0,1212 + 0,0004 \cdot x$		0,764	150	254
STREET u. CLOSE (SCE) - PHADEBAS UM 8304 (E)	$y = 0,0618 + 0,0141 \cdot x$		0,651	180	254
STREET u. CLOSE (Ext.) - PHADEBAS UM 8304 (E)	$y = 0,0656 + 3,5001 \cdot x$		0,632	190	254
STREET u. CLOSE (SCE) - STREET u. CLOSE (E·10)	$y = 0,0044 + 0,0387 \cdot x$		0,986	40	254
(Lipase)					
RICK (U/l)	$y = 7,65 + 0,8780 \cdot x$		0,948	21	254
- modif. Methode (U/l)					
URIN					
RICK u. STEGBAUER (U/l) - STREET u. CLOSE (SCE)	$y = 2,2876 + 0,0276 \cdot x$		0,943	170	150
- STREET u. CLOSE (E·10)	$y = 0,0629 + 0,00058 \cdot x$		0,908	224	150
- PHADEBAS VL 1611 (E)	$y = 0,0104 + 0,00035 \cdot x$		0,927	195	150
STREET u. CLOSE (SCE) - PHADEBAS VL 1611 (E)	$y = 0,0027 + 0,0164 \cdot x$		0,891	237	150
STREET u. CLOSE (Ext.) - PHADEBAS VL 1611 (E)	$y = 0,0036 + 5,0507 \cdot x$		0,846	279	150
STREET u. CLOSE (SCE) - STREET u. CLOSE (Ext.)	$y = 0,0011 + 0,00212 \cdot x$		0,975	12	150

Die Streuung der Meßwerte um die Regressionsgerade (2s-Bereich) liegt bei den Serumamylasen um 150 U/l, das entspricht etwa 40 % der oberen Normalbereichsgrenze von rund 400 U/l. Bei den Urinalanalysen entspricht der 2s-Bereich etwa 20 % der oberen Normalbereichsgrenze und läßt hiermit im Grenzbereich die Enzymaktivitäten sicherer bestimmen als im Serum.

Tab. 7 zeigt darüber hinaus, daß die jodometrische Methode mit der Referenzmethode besser korreliert als die Chromogenmethode.

Bei den Serumuntersuchungen ergab der Phadebas-Test 17 mal und die jodometrische Methode 3 mal deutlich abweichende Ergebnisse von der Referenzmethode; bei den Urinuntersuchungen standen 4 falschpathologische Phadebas-Tests keinem falschen jodometrischen Testergebnis gegenüber. Die meisten pseudoerhöhten Amylaseaktivitäten beim Phadebas-Test wurden bei lipämischen Seren gefunden, deren Aktivitätsbestimmung mit diesem Test nicht zuverlässig durchführbar ist.

Die verbesserte Lipasemethode zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der Meßwerte im Vergleich zur Referenzmethode. Die Streuung von 21 U/l beträgt nur 14 % der oberen Normalbereichsgrenze von 150 U/l.

Vergleicht man die Testergebnisse der beiden Amylase- und der modifizierten Lipasemethode in Bezug auf die methodisch bedingte Streuung der Meßwerte, so übertrifft die Lipasemethode deutlich die beiden Amylasemethoden an diagnostischer Sicherheit.

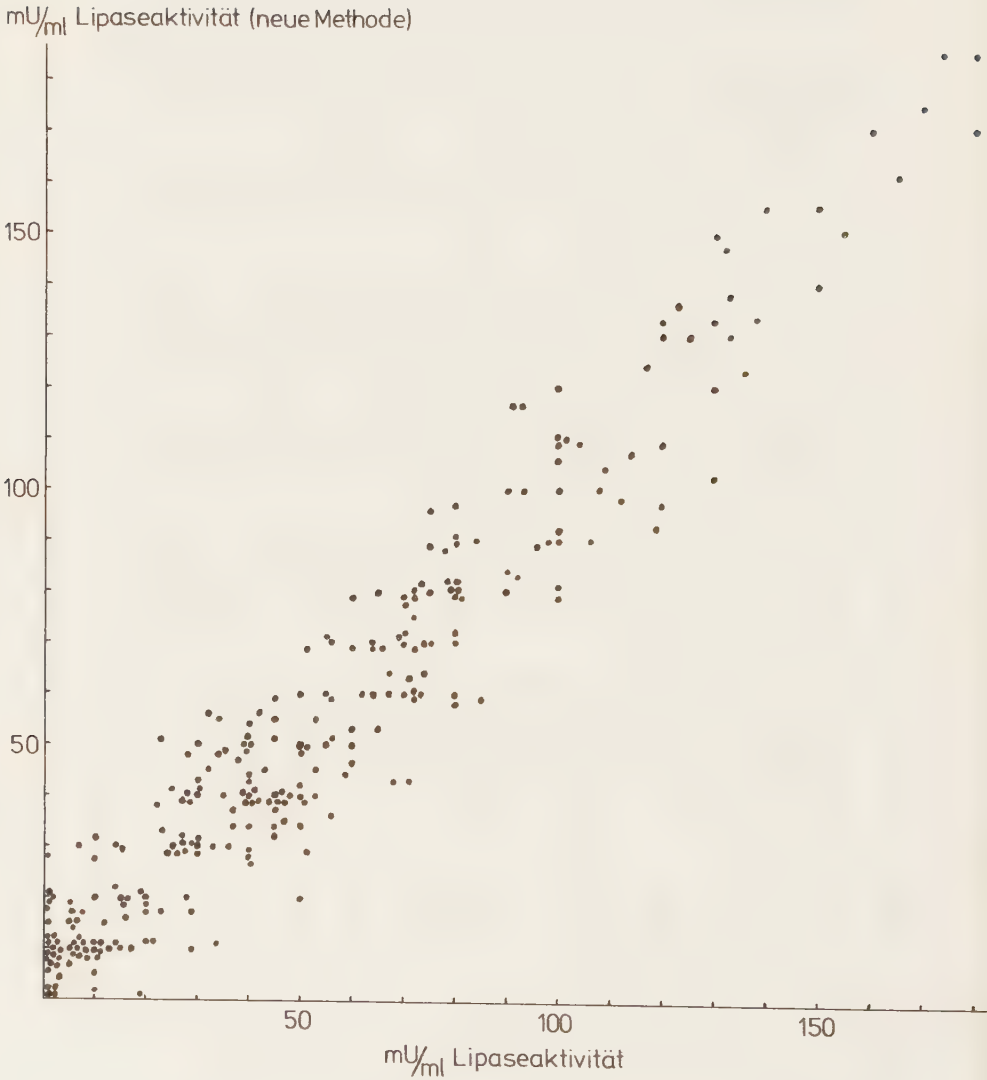


Abb. 35

Korrelation der Serumlipaseaktivitäten des Normalkollektivs und pathologischer Werte gemessen mit der Referenzmethode und der verbesserten Methode.

SCE

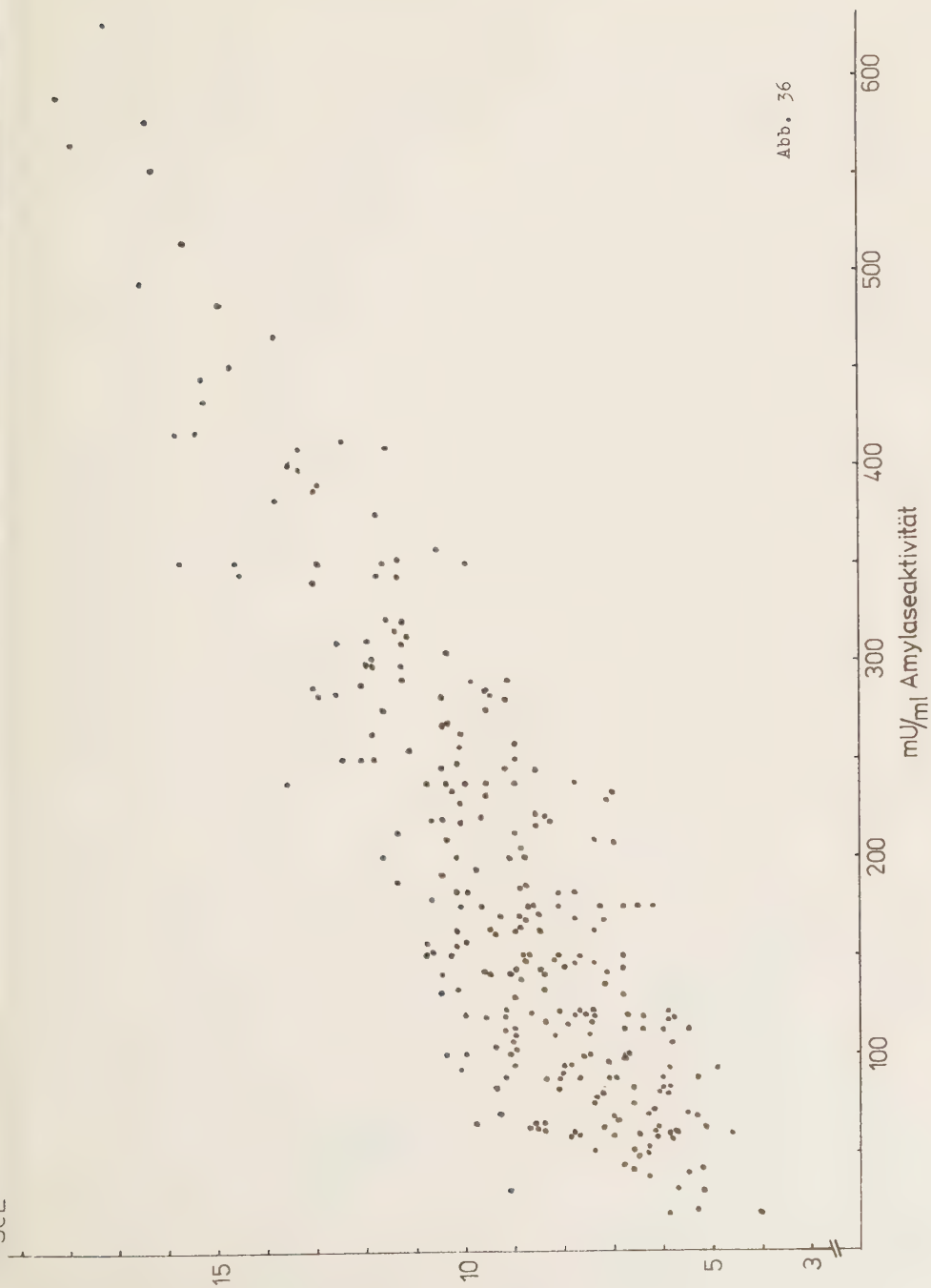


Abb. 36



Abb. 38

mU/ml Amylaseaktivität

1000

500





Abb. 39 a



Abb. 36: Korrelation der Serumamylaseaktivitäten des Normalkollektivs und pathologischer Werte gemessen mit der Referenzmethode und der Methode nach STREET u. CLOSE (25°C).

Abb. 37: Korrelation der Serumamylaseaktivitäten des Normalkollektivs und pathologischer Werte gemessen mit der Referenzmethode und der Chromogenmethode (25°C).

Abb. 38: Korrelation der Urinamylaseaktivitäten des Normalkollektivs und pathologischer Werte gemessen mit der Referenzmethode und d. Methode nach STREET u. CLOSE (25°C).

Abb. 39: Korrelation der Urinamylaseaktivitäten des Normalkollektivs und pathologischer Werte gemessen mit der Referenzmethode und der Chromogenmethode (25°C).

5.2. Methodischer Aufwand der einzelnen Tests unter besonderer Berücksichtigung im Routineeinsatz:

Von den drei getesteten Lipasemethoden ist die RICK'sche Methode die bei weitem aufwendigste. Es bedarf nicht nur eines großen finanziellen Aufwands für die Apparatur, sondern auch eines geschulten Personals, das die Fehlerquellen der Methodik genau kennt. In der Routine lassen sich mit dieser Methode bis zu 25 Tests pro Tag durchführen, wobei damit eine Arbeitskraft blockiert ist. Sortiert man vor dieser quantitativen Analyse die Lipaseaktivitäten unterhalb des Normalbereichs mit Hilfe eines Schnelltests aus, so läßt sich der Tagesdurchsatz noch etwas anheben.

Diese Vorauslese ist auch bei dem modifizierten Lipasetest zu empfehlen, wobei wünschenswerterweise automatisch eine Kontrolle der pathologischen Werte erfolgt. Hierbei muß man nun abwägen, ob der methodische Aufwand der RICK'schen Methode mit einer gering höheren Meßgenauigkeit im unteren pathologischen Bereich gegenüber dem einfach durchzuführenden modifizierten Lipasetest diagnostisch von Bedeutung ist.

Für 40 Tests benötigt man mit dem Lipaseschnelltest 80 min. Werden nun noch 8 Seren mit dem modifizierten Test analysiert, so sind nochmals 36 min in Rechnung zu stellen. Werden diese 40 Tests nur mit dieser quantitativen Methode durchgeführt, so werden 150 min für Ansatz, Messung und Auswertung benötigt.

Ein Schnelltest kann erstens als Suchtest zur Trennung zwischen normal und pathologisch eingesetzt werden und zweitens soll er nur schnell anzeigen, ob eine akute Erkrankung vorliegt, um möglichst bald therapeutische Schritte einleiten zu können.

Die letztgenannte Aufgabe kann der Suchtest leicht lösen, da immer große Aktivitätsdifferenzen vorliegen und der Farbumschlag auch bei ungenauer Startpunkteinstellung sichtbar ist. Wird dieser Schnelltest aber als Screeningtest eingesetzt, so erwartet man bevorzugt eine hohe Empfindlichkeit im Grenzbereich.

Um beide Aufgaben mit einer Analysenmethodik erfüllen zu können, muß erstens der Farbumschlag im Grenzbereich innerhalb kleiner Enzymaktivitätsintervallen deutlich sein und zweitens muß der Schnelltest einen möglichst weiten Enzymaktivitätsbereich diagnostisch abdecken.

Wie schon im methodischen Teil dargelegt, sind beide Anforderungen beim Lipaseschnelltest erfüllt worden, wobei besonders bei den Screeninguntersuchungen etwas Sorgfalt bei der Startpunkteinstellung gefordert werden muß. Die Verlässlichkeit des Lipaseschnelltests wurde in der Routine an 580 Seren parallel zur modifizierten Lipasemethode geprüft.

Auf Grund des geringen Zeitbedarfs und der Zuverlässigkeit des Testergebnisses, sollte auch der Amylaseschnelltest in jedem Fall vor der quantitativen Analytik ausgeführt werden.

Die Beurteilung der Brauchbarkeit der quantitativen Serumamylasetests im Routineeinsatz ist schwierig, da kein Test methodisch fehlerfrei arbeitet. Bei der Referenzmethode stört der Proteinniederschlag im Ansatz, bei der Chromogenmethode können pseudopathologische Enzymaktivitäten bei lipämischen Seren gefunden werden und bei der jodometrischen Methode können ebenfalls bei sehr eiweißhaltigen Seren falschpositive Ergebnisse resultieren.

Bei der jodometrischen Methode kann man bei der Serum- und Urinbestimmung ohne Probenverdünnung nur einen beschränkten Enzymaktivitätsbereich erfassen. Doch die Unkompliziertheit des Analysenverfahrens wiegt diesen methodischen Nachteil bei

weitem auf, zumal man auch auf Grund des vorgeschalteten Schnelltests schon die richtige Probenverdünnung ablesen kann.

Ebenfalls läßt sich dieser Test mit Hilfe zweier Dispenser sehr gut halbautomatisieren.

So würde ich, aus meiner Erfahrung heraus, die jodometrische Methode für die Amylasebestimmung in der Routine favorisieren, zumal die Lipaseaktivitätsbestimmung zum wichtigsten Parameter in der enzymatischen Pankreasdiagnostik geworden ist (s.S. 133) und man so bei der Amylaseaktivitätsmessung auf große Genauigkeit der Testergebnisse verzichten kann.

Für die Vorfelddiagnostik des niedergelassenen Arztes ist die Bestimmung der Amylaseaktivität im Urin und als zweiter Test möglichst noch der Lipaseschnelltest zur Früherkennung einer akuten Pankreatitis ausreichend.

6. Haltbarkeit der Amylase und Lipase im Serum und der Amylase im Urin

Da die Untersuchungen aus zeitlichen Gründen meist nicht am gleichen Tag der Probengewinnung durchgeführt werden konnten, mußte die Haltbarkeit der Serum- und Urinproben bei verschiedenen Lagertemperaturen geprüft werden.

Mindestens zwei Proben wurden portioniert bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) und Tageslicht, bei 4°C im Kühlschrank und eingefroren bei -24°C aufbewahrt. Es wurden die in Tab. 8 wiedergegebenen Haltbarkeitsdaten erhalten.

Tab. 8

Haltbarkeit der Amylase und Lipase im Serum und der Amylase im Urin bei verschiedenen Lagertemperaturen

Aufbewahrung der Proben	Serumlipase	Haltbarkeit der Serumamylase	Urinamylase
bei Zimmertemperatur (ca. 20°C)	etwa 7 Tage ¹⁾	etwa 7 Tage ¹⁾	mindestens 7 Tage
im Kühlschrank (4°C)	etwa 30 Tage ¹⁾	mindestens 30 Tage ¹⁾	mindestens 30 Tage
eingefroren (-24°C)	mindestens 2 Jahre	mindestens 2 Jahre	7 Tage

1) einsetzendes Bakterienwachstum erhöht die "Enzymaktivität"

Die Lipaseaktivität wurde nach der Methode von RICK und die Amylaseaktivität im Serum nach der Methode von RICK und STEGBAUER und die im Urin nach der Chromogenmethode bestimmt.

Zu beachten ist die einerseits schnelle Abnahme der Amylaseaktivität im eingefrorenen Urin und andererseits die lange Haltbarkeit dieses Enzyms im Urin bei Aufbewahrung im Kühlschrank. Die Amylaseaktivität der eingefrorenen Urine fällt nach 7 Tagen ab, um nach 120 Tagen auf ein Viertel der Ausgangsaktivität und nach 8 Monaten auf eine eben noch meßbare Enzymaktivität abzufallen.

Die in den Urinen enthaltenen Substanzen erniedrigen den Ge-

frierpunkt der Proben so sehr, daß sogar bei -24°C die Urine nicht hart gefroren sind. Bei dieser Temperatur wird nur eine sehr weiche Eismasse vorgefunden. Es ist anzunehmen, daß die Amylase durch die im wässrigen Anteil des Eises vorhandenen Substanzen, wie z.B. Harnstoff, verändert wird und so langsam an Aktivität verliert. Die lange Haltbarkeit der Urin-Amylase bei Lagerung im Kühlschrank weist darauf hin, daß bakterieller Abbau für diesen Aktivitätsverlust nicht verantwortlich sein kann.

Vielleicht ist durch eine noch niedrigere Lagertemperatur die Haltbarkeit der Urinamylase zu verlängern.

HOWE und ELMSLIE (32) beobachteten, daß erhöhte Amylaseaktivitäten im Serum innerhalb von 22 Stunden nach Blutentnahme eine Abnahme auf 50 bis 60 % der Ausgangswerte erfahren. Dieser Effekt war unabhängig von der Probenlagerung zwischen 37 und -19°C . Amylaseaktivitäten im Normalbereich zeigten keine Aktivitätsabnahme.

Da ich diesen Amylaseaktivitätsverlust nicht beobachten konnte, habe ich die Enzymaktivität jeweils einer Serum- und Urin-amylase im Normal- und hochpathologischen Bereich innerhalb eines Zeitraums von zwei bis 28 Stunden nach der Probengewinnung fünfmal bestimmt. Die Proben wurden portioniert bei 22°C , 4°C und gefroren bei -24°C aufbewahrt.

Die Serum- und Urinamylasen im Normal- und hochpathologischen Bereich behielten innerhalb des Zeitintervalls von 26 Stunden bei allen drei Aufbewahrungsweisen ihre Ausgangsaktivitäten bei.

7. NORMALBEREICHE

7.1. Normalkollektiv

Um Proben der verschiedensten Altersgruppen zu erhalten, wurden die Seren von Probanden der medizinischen Poliklinik (Einstellungsuntersuchung), der Kinderklinik und einer Praxis für Allgemeinmedizin untersucht. Die Blutproben wurden morgens vom nüchternen Probanden entnommen.

Bei jedem Probanden wurden außer einer klinischen Untersuchung mindestens die BSG, ein kleines Blutbild und eine Urinkontrolle (Labstix) mit Sediment durchgeführt.

Um einen eventuellen Einfluß der Antikonzeptiva auf die Amylase- oder Lipaseaktivität im Serum aufzudecken, wurden die über 15 jährigen weiblichen Probanden in je eine Gruppe mit (n=36) und ohne Antikonzeptiva eingeteilt.

Über die Alters- und Geschlechtsverteilung des Normalkollektivs der Serumanalysen gibt Abb. 40 Auskunft. Das mittlere Alter des Normalkollektivs betrug 28,1 Jahre. Leider waren nur wenige über 61 Jahre alte Probanden auf Grund ihres Gesundheitszustandes für eine Normalwertbestimmung geeignet.

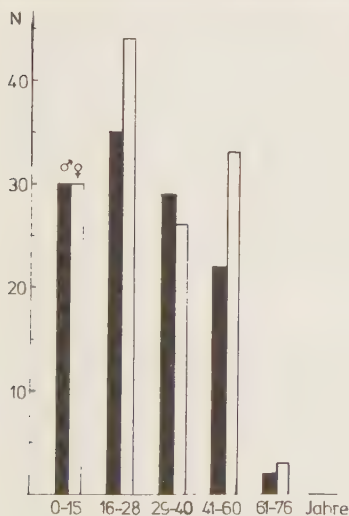


Abb. 40

Normalkollektiv der Serumanalysen

n männlich = 119
n weiblich = 135

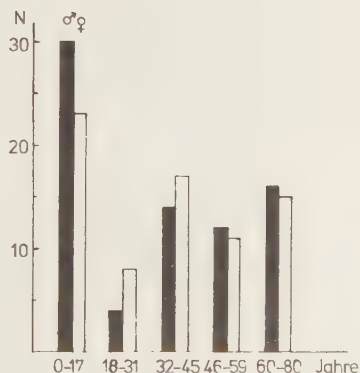


Abb. 41

Normalkollektiv der Urinalysen

n männlich = 76
n weiblich = 74

Eigentlich war geplant, die Serum- und Urinanalysen simultan vom gleichen Probanden zu untersuchen, um den Serumamylasespiegel in Beziehung zur Urinamylaseausscheidung setzen zu können. Die Urinproben wurden eingefroren aufbewahrt und erst drei Monate nach der Probenentnahme analysiert. Dabei stellte es sich leider heraus, daß die Amylase in dieser Zeit in den Proben inaktiviert war (s. Tab. 8).

Aus diesem Grund wurden erneut Urinproben von dem Patientenstamm einer Praxis für Allgemeinmedizin mit der in Abb. 41 zusammengestellten Alters- und Geschlechtsverteilung gesammelt. Das mittlere Alter des Normalkollektivs betrug 36 Jahre. Die Morgenurine wurden als Einmalportionen gewonnen. Auf eine definierte Sammelperiode der Urinproben wurde verzichtet, da dieses Vorgehen in der Praxis nur schwer realisierbar ist. Um dennoch eine mögliche Verfälschung der Amylaseaktivitäten in verschiedenen konzentrierten Urinen festzustellen, wurden zusätzlich die Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen in den Urinen bestimmt.

Die Urinproben der klinisch gesunden Probanden wurden auf Glukosurie, Hämaturie, Proteinurie und Ketonurie untersucht (N-Labstix). Eine pathologische Cyturie oder Pyurie wurde quantitativ durch eine Sedimentuntersuchung ausgeschlossen.

Die Urine wurden sofort nach Gewinnung aufgeteilt. Ein Teil wurde zur Amylasebestimmung bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und innerhalb von 5 Tagen analysiert (Haltbarkeit s. Tab. 8). Der andere Teil wurde bis zur Kreatinin- und Harnstoffbestimmung eingefroren bei -24°C in Kunststoffgefäßen gelagert.

Auch bei den Urinanalysen wurden die Probandinnen nach Antikonzeptivaeinnahme befragt ($n=7$) und die Proben Schwangerer ($n=7$) besonders gekennzeichnet.

Zur Qualitätskontrolle der Normalwertanalysen lief das Kontrollserum (4.1.) jeden Tag in Doppelbestimmung mit. Außerdem wurde das Kontrollserum bei jeder Analysenserie meist in Einfachbestimmung mitgeführt.

7.2. Normalbereiche der Amylase- und Lipaseaktivität im Serum

Nach der Amylase- und Lipaseaktivitätsbestimmung der Seren des Normalkollektivs wurden 20 Proben mit den höchsten Enzymaktivitäten noch einmal durch zusätzliche klinische oder klinisch-chemische Untersuchungen auf ihre Brauchbarkeit als "Normalwert" untersucht.

Bei 9 Probanden konnte kein pathologischer Befund erhoben werden, so daß sie ins Normalkollektiv aufgenommen wurden.

Die restlichen 11 Probanden wurden bei der Normalbereichsrechnung nicht berücksichtigt: Bei 2 Kleinkindern wurde unklares Erbrechen und unklares Abdomen diagnostiziert. Bei den übrigen Probanden wurden entweder erhöhte Serumkreatininwerte (über 1,3 mg/100 ml) oder erhöhte Cholesterin- (über 285 mg/100 ml) oder Neutralfettwerte (über 200 mg/100 ml) gefunden.

Bei den Probanden mit erhöhten Serumkreatininwerten, bei denen man eine Nierenfunktionsstörung annehmen kann, lagen nur die Amylaseaktivitäten höher als die übrigen Werte des Normalkollektivs, während sich die Lipaseaktivitäten im unteren Normalbereich befanden.

Demgegenüber verhielten sich diese beiden Enzymaktivitäten bei den Seren mit Hyperlipidämie nicht immer gleichsinnig. Es wurden Lipaseaktivitäten zwischen 150 und 230 U/l gemessen. Diese lipolytischen Enzymaktivitäten könnten zum einen durch einen erhöhten Gehalt an Lipoproteinlipase bedingt sein. Zum anderen wäre zu diskutieren, ob die Hyperlipidämie als symptomatische Hyperlipidämie bei Pankreasaffektion oder als primäre Noxe des Pankreas zu werten ist.

Ergebnisse:

Die Normalwertverteilung beider Enzyme unterschied sich bei den Probandinnen, die Antikonzeptiva einnahmen, nicht signifikant von den Probandinnen ohne Antikonzeptivaeinnahme.

7.2.1. Normalbereich der Serumlipaseaktivität:

Die Meßergebnisse beider Lipasebestimmungsmethoden ergaben keine signifikante Geschlechtsabhängigkeit aber eine signifikante Altersabhängigkeit der männlichen Probanden ($p < 0,01$).

Die statistische Prüfung auf Normalität ergab bei Berücksichtigung aller Altersgruppen eine log-normale Verteilung der Normalwerte (außerhalb der 0,5 % Schranke). Von Altersgruppe zu Altersgruppe war keine einheitliche Verteilungsform verifizierbar. Abb. 42 zeigt die Normalwertverteilung aller Altersgruppen. Subtrahiert man nun die negativ asymptotisch verteil-

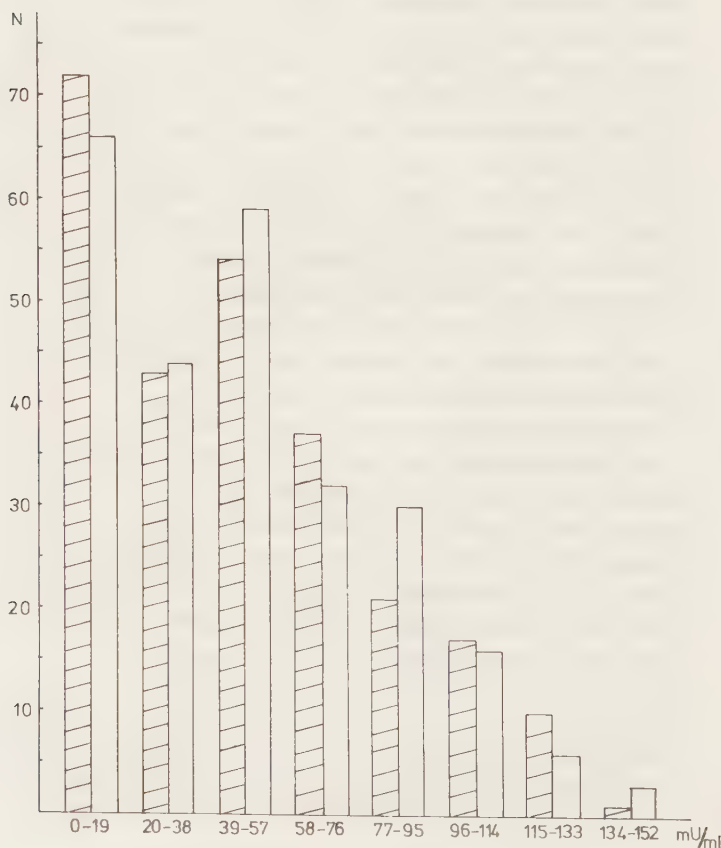


Abb. 42

Serumlipaseaktivitätsverteilung des Normalkollektivs mit allen Altersgruppen

RICK'sche Methode = schraffierte Säulen
modifizierte Methode = unschraffierte Säulen



Abb. 43

Serumlipaseaktivitätsverteilung der 1. Altersgruppe des Normalkollektivs (0 - 15 Jahre)

RICK'sche Methode = schraffierte Säulen

modifizierte Methode = unschraffierte Säulen

ten Normalwerte der 0 - 15 jährigen Probanden (Abb. 43) von den Meßwerten des Gesamtkollektivs (Abb. 42), so erhält man eine log-normale Verteilung der Meßwerte der über 15 jährigen Probanden. Der unteren Grenze des Normalbereichs der Lipase- und Amylaseaktivität im Serum schreibe ich keine diagnostische Bedeutung zu, da diese beiden Pankreasenzyme keine obligaten, serumeigene Enzyme sind, so daß ihre Abwesenheit im Blut bei einem Pankreasgesunden eigentlich der Normalzustand sein sollte. Ein Hinweis hierauf gibt die Altersabhängigkeit und Verteilung des Normalbereichs der Lipaseaktivität. Aus diesem Grunde habe ich auf die Angabe des statistisch errechneten unteren Normalbereichs verzichtet.

In Tab. 9 sind alle näheren Angaben über die Berechnung des Normalbereichs und seine Altersabhängigkeit dargelegt. Die die Altersabhängigkeit beschreibenden Gleichungen sind mit nicht-transformierten Meßergebnissen errechnet worden. Da aber eine log-normale Normalwertverteilung vorlag, mußten die F - Werte der mit nicht transformierten Meßwerten errechneten Varianzen mit den F - Werten der log-transformierten Meßwerte verglichen werden.

Tab. 9 a

Altersabhängigkeit und Normalbereiche der Serumlipaseaktivität
Meßwerte des Normalkollektivs (Abb. 40)

	Methode	
	RICK	modifiziert
<u>männliche Probanden</u> N = 119	signifikante Altersabhängigkeit $p < 0,01$	
lineare Meßwerte: F - Wert	12,12	12,62
Altersabhängigkeit beschrieben durch Gleichung	$y=24,94+0,672 \cdot x$	$y=28,83+0,635 \cdot x$
log-transf. Meßwerte: F - Wert	9,86	15,73
2 s - Bereich (U/l)	71	65
<u>weibliche Probanden</u> N = 135	keine signifikante Altersabhängigkeit nachweisbar	
lineare Meßwerte: F - Wert	0,740	1,288
Altersabhängigkeit beschrieben durch Gleichung	$y=40,13+0,0136 \cdot x$	$y=42,13+0,0170 \cdot x$
log-transf. Meßwerte: F - Wert	0,953	3,6417
2 s - Bereich (U/l)	69	65
<u>alle Probanden</u> N = 254	signifikante Altersabhängigkeit $p < 0,01$	
lineare Meßwerte: F - Wert	9,40	11,86
Altersabhängigkeit beschrieben durch Gleichung	$y=33,63+0,413 \cdot x$	$y=35,35+0,428 \cdot x$
log-transf. Meßwerte: F - Wert	7,18	17,60
2 s - Bereich (U/l)	69	64

x = Alter in Jahren

y = Lipaseaktivität in U/l

Varianzanalysen siehe 12.1.1. und 12.1.2.

Tab. 9 b

Normalbereiche (2s- Bereich)

Alter in Jahren	Methode	
	RICK	modifiziert
0 - 15 (nicht errechnet)	bis 90 U/l	bis 90 U/l
25 (männlich)	bis 113	bis 110
65 (männlich)	bis 140	bis 135
Frauen über 15	bis 114	bis 113
25 (beide Geschlechter)	bis 113	bis 110
65 (beide Geschlechter)	bis 129	bis 127
berechnet nach dem Mittelwert $\bar{y}$ ohne Altersabhängigkeit $\bar{x} + 2s$ vom Mittelwert	45,3 bis 114	47,4 bis 111

Auch WEBER (13) fand die gegenüber Erwachsenen niedrigeren Normalwerte der Lipaseaktivitäten bei Kindern. Vielleicht könnte dies die Frühdiagnose der Mukoviscidose bei Kindern erleichtern. Jedenfalls konnte ich bei einem einjährigen Mädchen (L.A. Aufnahme Nr. 295/72) mit durch Iontophorese gesicherter Mukoviscidose eine erhöhte Serumlipaseaktivität von 140 U/l bei einer normalen Serumamylaseaktivität von 219 U/l messen.

RICK (11) bestimmte den Normalbereich bei 125 Gesunden mit einem Mittelwert von 51 U/l und in den Grenzen $\bar{x} - 2s = 18$ U/l und $\bar{x} + 2s = 141$ U/l. Die Meßwerte waren ebenfalls log-normal verteilt.

Bei Verwendung einer neuen Olivenölsubstratzubereitung fanden FRIED und HOEFMAYER (88) mit $2 - 40$ U/l (37°C , pH = 8,0) bei 100 Gesunden wesentlich niedrigere Normalwerte der Serumlipaseaktivität.

7.2.2. Normalbereich der Serumlipaseaktivität:

Die log-transformierten Meßergebnisse der Amylasebestimmungsmethoden ergaben keine signifikante Geschlechtsabhängigkeit. Diese konnte nur bei den nicht transformierten Meßwerten der jodometrischen Methode verifiziert werden.

Die statistische Prüfung auf Normalität zeigte bei Berücksichtigung aller Altersgruppen bei RICK u. STEGBAUER und STREET u. CLOSE eine logarithmische Verteilung der Normalwerte (außerhalb der 0,5 % Schranke), die aber nicht bei allen Altersgruppen (Abb. 40) erkennbar ist. (Abb. 44 - 46)

Die Chromogenmethode ergab bei der statistischen Berechnung aller Altersgruppen nur eine schwache Signifikanz für eine logarithmische Normalwertverteilung (außerhalb der 5 % Schranke). Bei den 6 Altersgruppen lag nur zweimal eine schwach signifikante log-Normalwertverteilung vor. Daher wurde zur Verdeutlichung der Verteilungsform die Amylaseaktivitäten in 12 Klassen eingeteilt und graphisch dargestellt (Abb. 46). Man erkennt deutlich die lineare Normalwertverteilung der Serumamylaseaktivität, die man nur mit der Chromogenmethode erhält und somit methodisch bedingt sein wird. Diese eindeutige Verschiebung der Meßwerte zu höheren Extinktionen hin kann auf einer geringeren Nachweisempfindlichkeit der Methode beruhen. Wahrscheinlicher ist aber die schon auf Seite 74 erwähnte individuelle Grundextinktion der Serumproben für diese nicht amylasespezifische Erhöhung der meßbaren Enzymaktivität verantwortlich, die zu einer Nivellierung der Meßwerte führt.

Bei allen drei Methoden war eine signifikante allgemeine Altersabhängigkeit der Serumamylaseaktivität nachweisbar. Tab. 10 a + b zeigen die bei den einzelnen Methoden gefundenen Abhängigkeiten.

Die jeweils signifikante Altersabhängigkeit der Chromogen- und der jodometrischen Methode, einmal bei der männlichen und bei den weiblichen Probanden, könnte zufällig bedingt sein, obwohl sie sehr deutlich ausfällt.

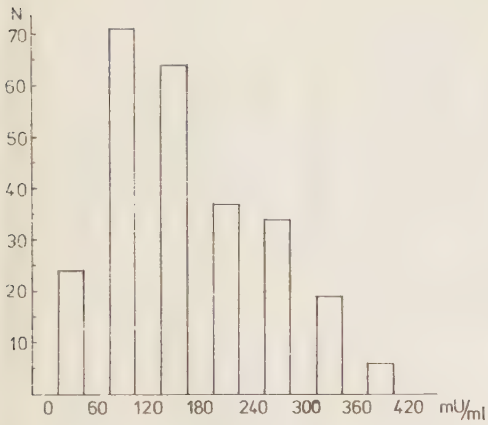


Abb. 44

Serumamylaseaktivitätsverteilung des
Normalkollektivs

Bestimmung nach RICK u. STEGBAUER

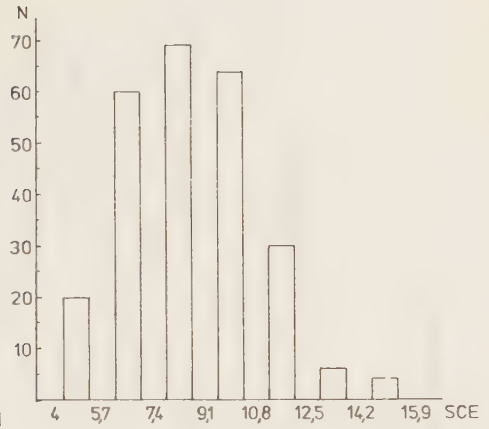


Abb. 45

Serumamylaseaktivitätsverteilung des
Normalkollektivs

Bestimmung nach STREET u. CLOSE

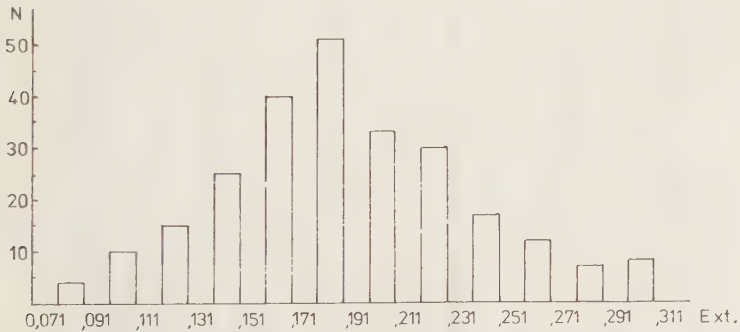


Abb. 46

Serumamylaseaktivitätsverteilung des Normalkollektivs

Bestimmung durch Chromogenmethode

Tab. 10 a

Altersabhängigkeit und Normalbereiche der Serumamylaseaktivität
Meßwerte des Normalkollektivs (Abb. 40)

	RICK u. STEGBAUER	Methode		PHAEDRAS
		STREET u. CLOSE		
<u>männliche Probanden</u> N = 119				
Altersabhängigkeit:	nicht signifikant	nicht signifikant	signifikant $p < 0,05$	
lineare Meßwerte: F - Wert	1,346	2,656	4,721	
Altersabhängigkeit be- schrieben durch Gleichung	$y_1 = 156,32 + 0,660 \cdot x$	$y_2 = 8,54 + 0,0204 \cdot x$	$y_3 = 0,1707 + 0,0012 \cdot x$	
log-transf. Meßwerte: F - Wert	2,212	2,690	4,825	
2 s - Bereich (U/l)	199	232	250	
<u>weibliche Probanden</u> N = 135				
Altersabhängigkeit:	nicht signifikant	signifikant $p < 0,05$	nicht signifikant	
lineare Meßwerte: F - Wert	1,671	4,446	1,452	
Altersabhängigkeit be- schrieben durch Gleichung	$y_1 = 144,39 + 0,600 \cdot x$	$y_2 = 7,87 + 0,024 \cdot x$	$y_3 = 0,1769 + 0,0001 \cdot x$	
log-transf. Meßwerte: F - Wert	2,321	5,125	1,400	
2 s - Bereich (U/l)	174	226	224	

	RICK u. STEGEMAUER	STREET u. CLOSE	PHADEBAS
<u>alle Probanden</u> $N = 254$ lineare Meßwerte: $\bar{F}$ - Wert	$p < 0,05$ 2,967	signifikante Altersabhängigkeit $p < 0,01$ 6,868	$p < 0,05$ 5,761
Altersabhängigkeit beschrieben durch Gleichung log-transf. Meßwerte: $\bar{F}$ - Wert	$y_1 = 150,08 + 0,624 \cdot x$ 4,739	$y_2 = 8,19 + 0,0216 \cdot x$ 7,230	$y_3 = 0,174 + 0,0001 \cdot x$ 6,027
2 s - Bereich (U/l)	186	229	234

y_1 = Amylaseaktivität in U/l x = Alter in Jahren

y_2 = " in SCE

y_3 = " in Ext.

Varianzanalysen siehe 12.1.3. bis 12.1.5.

Tab. 10 b

Normalbereiche (2s - Bereich)

Alter in Jahren	Methode		
	RICK u. STEGBAUER	STREET u. CLOSE	PHADEBAS
0 - 15 männl. weibl.	bis 365 U/l 327	bis 402 U/l 366	bis 420 U/l 366
25 männl.	bis 372	bis 411 U/l 13,4 SCE	bis 452
65 männl.	bis 398	bis 470 U/l 14,3 SCE	bis 569
25 weibl.	bis 333	bis 375 U/l 12,7 SCE	bis 369
65 weibl.	bis 357	bis 425 U/l 13,7 SCE	bis 379
25 bd. Geschl.	bis 352	bis 392 U/l 13,1 SCE	bis 375
65 bd. Geschl.	bis 377	bis 440 U/l 13,9 SCE	bis 384
berechnet nach dem Mittelwert y ohne Alters- abhängigkeit	168	167 U/l 8,8 SCE	163 U/l 0,186 Ext.
y+2s vom Mittel- wert	bis 354	bis 396 U/l 13,1 SCE	bis 397 U/l 0,280 Ext.

In der Arbeitsanleitung des Merckotest a-Amylase Packs wird der Normalbereich der Serumamylase nach CLOTTON bis 63 SCE (37°C) angegeben. Diese obere Normalbereichsgrenze ist doppelt so hoch wie die von mir berechnete Grenze von durchschnittlich 14 SCE (25°C) beziehungsweise 32 SCE (37°C) unter Berücksichtigung des Temperaturfaktors 2,3 (s.S. 66) für die um 12°C höhere Inkubationstemperatur. Diese Normalbereichsgrenze von etwa 32 SCE (37°C) stimmt gut mit den von STREET u. CLOSE (36) veröffentlichten Normalwerten von 6 - 33 SCE überein. CESKA (34) fand keine Altersabhängigkeit der Serumamylase und bestimmte den Normalbereich mit 88 - 282 U/l für männliche und

86 - 226 U/l für weibliche Probanden. Die Analysenbedingungen waren: 0,025 ml Serum, 30 min Inkubationszeit, 37°C als Inkubationstemperatur und ein Endvolumen von 1,025 ml. Da das Chromogensubstrat doch sehr different von der löslichen Stärke ist, kann der oben erwähnte Temperaturfaktor bei dieser Methode nicht angewandt werden.

7.3. Normalbereich der Amylaseaktivität im Urin:

Auf die Bestimmung der Lipaseaktivität im Urin (6,46,63) wurde verzichtet, da die Anwesenheit lipolytischer Enzyme im Urin durch neuere Untersuchungen meist nicht bestätigt werden konnte (7,94).

Die nicht transformierten Meßergebnisse der Urinamylase zeigen eine Altersabhängigkeit der einzelnen Probandengruppen ($p < 0,05$), verbunden mit einer allgemeinen Altersabhängigkeit ($p < 0,01$) aller Probanden. Die log-transformierten Meßergebnisse zeigen eine signifikante ($p < 0,01$) Geschlechtsabhängigkeit. (Tab. 11 a + b)

Die Meßwerte dieser drei Methoden sind bei Berücksichtigung aller Altersgruppen log-normal verteilt (außerhalb der 0,5 % Schranke). (Abb. 47 - 49)

Da Schwangere (N=7) und Antikonceptiva einnehmende Probandinnen (N=7) signifikant höhere Amylaseaktivitäten im Urin aufwiesen, wurden deren Meßwerte bei der Normalbereichsberechnung ausgeschlossen. Diese erhöhten Urinamylaseaktivitäten werden auf die um 30 % angehobene Nieren clearance bei Schwangeren zurückzuführen sein.

Tab. 11 zeigt, daß die Amylaseaktivität im Urin mit steigendem Alter niedriger wird.

Der aus der statistischen Berechnung der Normalwerte ablesbare signifikante Geschlechtsunterschied wird, wie man aus Tab 11 b entnehmen kann, auf Grund der großen Streubreite (2s) der Meßergebnisse verdeckt und ist so für die klinische Diagnostik vernachlässigbar.

RICK u. STEGBAUER fanden auch eine logarithmische Normalwertverteilung und bestimmten die obere Normalbereichsgrenze ($x+2s$) für Männer (N=50) mit 1980 U/l und für Frauen (N=50) mit 3250 U/l. Diese hohen Normalbereiche konnte ich nicht verifizieren.

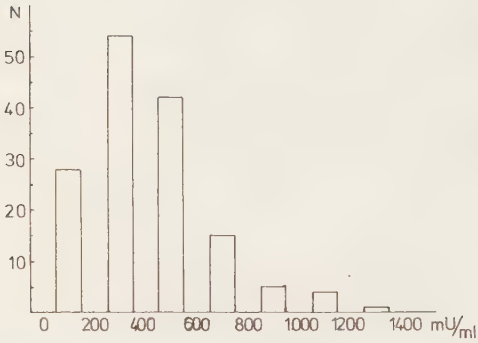


Abb. 47

Urinamylaseaktivitätsverteilung des
Normalkollektivs

Bestimmung nach RICK u. STEGBAUER

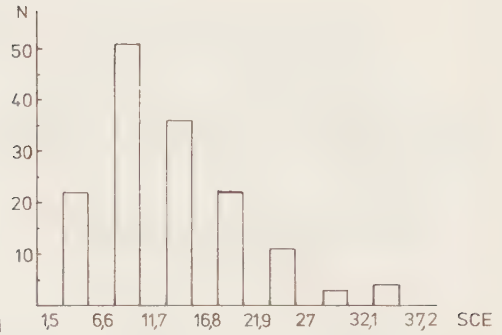


Abb. 48

Urinamylaseaktivitätsverteilung des
Normalkollektivs

Bestimmung nach STREET u. CLOSE

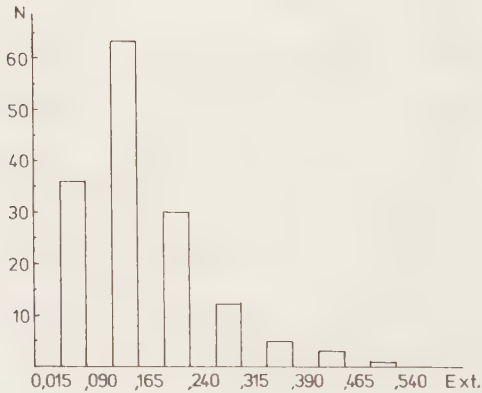


Abb. 49

Urinamylaseaktivitätsverteilung des
Normalkollektivs

Bestimmung durch Chromogenmethode

Tab. 11 a

Altersabhängigkeit, Geschlechtsabhängigkeit und Normalbereiche der Urinamylaseaktivität
 Meßwerte des Normalkollektivs (Abb. 41)

	Methode		
	RICK u. STEGHAUER	STREET u. CLOSE	PHADEBAS
<u>männliche Probanden</u> N = 76		Altersabhängigkeit signifikant $p < 0,05$	nicht signifikant
lineare Meßwerte: F - Wert	4,201	5,321	3,487
Altersabhängigkeit beschrieben durch Gleichung	$y_1 = 544,77 - 2,645 \cdot x$	$y_2 = 17,85 - 0,0852 \cdot x$	$y_3 = 0,2025 - 0,0012 \cdot x$
log-transf. Meßwerte: F - Wert	4,112	5,643	3,489
2 s - Bereich (U/l)	528	544	575
<u>weibl. Probanden</u> N = 74		signifikante Altersabhängigkeit $p < 0,05$	
lineare Meßwerte: F - Wert	5,037	4,225	4,312
Altersabhängigkeit beschrieben durch Gleichung	$y_1 = 529,76 - 3,28 \cdot x$	$y_2 = 16,83 - 0,0888 \cdot x$	$y_3 = 0,2033 - 0,0012 \cdot x$
log-transf. Meßwerte: F - Wert	4,125	2,657	3,083
2 s - Bereich (U/l)	561	596	628

	RICK u. STEGBAUER	STREET u. CLOSE	PHADEBAS
<u>alle Probanden</u> N = 150 lineare Meßwerte: F - Wert Altersabhängigkeit be- schrieben durch Gleichung 2 s - Bereich (U/l)	 9,302 $y_1 = 536,34 - 2,96 \cdot x$ 543	 9,558 $y_2 = 17,33 - 0,0875 \cdot x$ 568	 7,841 $y_3 = 0,2025 - 0,0012 \cdot x$ 600
log-transf. Meßwerte: F - Wert	Geschlechtsabhängigkeit der Normalwerte $p < 0,01$ 7,091	 $p < 0,01$ 6,952	 $p < 0,05$ 4,890

x = Alter in Jahren

y_1 = Amylaseaktivität in U/l

y_2 = Amylaseaktivität in SOE

y_3 = Amylaseaktivität in Ext.

Varianzanalysen siehe 12.1.6. bis 12.1.8.

Tab. 11 b

Normalbereiche (2s - Bereich)

Alter in Jahren	Methode		
	RICK u. STEGBAUER	STREET u. CLOSE	PHADEBAS
0 - 15 männl.	bis 1033 U/l	bis 1057 U/l 31,7 SCE	bis 1071 U/l
0 - 15 weibl.	bis 1042	bis 1059 U/l 31,8 SCE	bis 1120
25 männl.	bis 1006	bis 1027 U/l 30,8 SCE	bis 1036
25 weibl.	bis 1009	bis 1039 U/l 31,2 SCE	bis 1084
65 männl.	bis 900	bis 903 U/l 27,4 SCE	bis 901
65 weibl.	bis 877	bis 911 U/l 27,6 SCE	bis 951
Schwangere u. Antikonceptiva einnehmende Probandinnen (nicht errech- net)	bis 1550	bis 1550 U/l 45 SCE	bis 1550
berechnet nach dem Mittelwert y ohne Altersab- hängigkeit	432	430 U/l 14,2 SCE	435
y + 2s vom Mit- telwert	974	998 U/l	1035

In der Arbeitsanleitung des Merckotest a-Amylase Packs wird der Normalbereich der Urinamylase nach CLOTTON bis 370 SCE (37°C) angegeben. STREET u. CLOSE (36) fanden 18 - 200 SCE (37°C) als Normalbereich, wobei CLOTTON und STREET u. CLOSE die Urinansätze 15 min inkubierten. Da ich die Inkubationszeit auf 10 min verkürzte, sind diese Normalbereiche nicht direkt mit den selbstbestimmten Normalwerten vergleichbar.

CESKA (34) fand weder eine Alters- noch eine Geschlechtsabhängig-

keit der Urinamylaseaktivität und gibt den Normalbereich mit 125 - 1590 für männliche und 192 - 1310 U/l für weibliche Probanden an. Die Analysenbedingungen und die Schwierigkeiten beim Vergleich dieser Werte mit den von mir gefundenen Normalbereichen, sind weiter vorne auf Seite 124 nachzulesen.

7.4. Korrelationen der Urinamylaseaktivität mit der Kreatinin- und Harnstoffkonzentration des Morgenurins:

Die in den Morgenurinen gemessenen Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen zeigen eine lineare Verteilung. Die Harnstoffwerte sind altersabhängig ($p < 0,01$) und zwar im Sinne einer Konzentrationsabnahme bei zunehmendem Alter ($y = 2790 - 13,3 \cdot x$). Während bei einem 10-jährigen der Konzentrationsbereich ($y \pm 2s$) bei 4340 - 970 mg/100 ml liegt, erreicht er bei einem 60-jährigen 3676 - 308 mg/100 ml. (s. 12.1.9.)

Die Kreatininwerte zeigen keine signifikante Altersabhängigkeit. Der Konzentrationsbereich, berechnet vom Mittelwert $y = 148,5$ mg/100 ml zuzüglich und abzüglich der doppelten Standardabweichung von 63 mg/100 ml, betrug 275 - 22 mg/100 ml.

Die Harnstoffwerte korrelieren signifikant ($p < 0,05$) mit den Kreatinin- ($r = 0,662$) und Urinamylasewerten ($r = \text{ca. } 0,39$). Die Kreatininausscheidung zeigt eine noch bessere Korrelation ($r = \text{ca. } 0,47$) mit der Urinamylaseaktivität.

Korrigiert man nun die Urinamylaseaktivitäten mit Hilfe des Urinkreatininwertes (Amylaseaktivität korr. = Amylaseaktivität dividiert durch die Kreatininkonzentration mal 100), um die Streubreite der Normalwertergebnisse um die Regressionsgerade durch verschieden konzentrierte Urine einzuengen, so erhält man auch absolut gesehen niedrigere Streubreiten um die Regressionsgerade. Aber vom niedrigeren Mittelwert aus betrachtet, werden prozentual gleichhohe Streubreiten gemessen, so daß sich der Aufwand einer gleichzeitigen Kreatininbestimmung im Urin nicht lohnt.

7.5. Korrelation der Amylase- und Lipaseaktivität im Serum gesunder Probanden

Beim Normalkollektiv korrelieren die Serumamylaseaktivitäten nicht signifikant mit den gleichzeitig gemessenen Serumlipaseaktivitäten. ($r = \text{ca. } 0,1$)

8. Vereinfachung des Sekretininduzierten Provokationstests mit Messung der Serumlipaseaktivität

Bei diesen Provokationstests wurde die Serumlipaseaktivität nur mit der modifizierten Methode bestimmt.

Die Sekretintests wurden wie folgt ausgeführt: nach der Gewinnung des Nüchternserums wurde dem Patienten 1 IE Sekretin pro kg Körpergewicht i.v. gespritzt und 30, 60 und 120 min nach dieser Injektion erneut eine Blutprobe entnommen. Es wurden also von jedem Patienten vier Blutproben benötigt.

Um diese Belastung des Patienten und den methodischen Aufwand zu reduzieren, wurde untersucht, ob und welche Belastungswerte man pro Sekretintest entbehren kann, ohne wesentlichen Verlust an Aussagekraft.

Dafür wurden 744 Sekretintests nach folgenden Kriterien ausgewertet:

ein Sekretintest wurde

als pathologisch gewertet, wenn die Lipaseaktivität einer Belastungsprobe über 195 U/l lag;

als grenzwertig gewertet, wenn mindestens ein Belastungswert zwischen 155 und 195 U/l lag und

als normal, wenn alle gemessenen Lipaseaktivitäten unter 155 U/l lagen.

Diese Grenzwerte sind auf Grund von eigenen Beobachtungen des Provokationstestverlaufs in Verbindung mit der Klinik festgelegt worden und gelten nur für Lipaseaktivitätsbestimmungen mit der modifizierten Lipasemethode oder der RICK'schen Methode.

Diese Einteilung setzt voraus, daß Sekretin-Provokationstests von Patienten ohne Pankreopathie keine über den Normalbereich hinausgehende Änderung der Lipaseaktivität im Serum zeigen. Wie SOMMER (17) und GOEBELL et al. (96) fanden auch wir diese

Prämisse bestätigt. Von 744 Sekretintests waren 535 normal, 69 wurden als grenzwertig und 140 als pathologisch eingestuft. Es konnten so 209 Provokationstests auf eine methodische Vereinfachung hin untersucht werden.

Ergebnis: Ein Belastungswert (30,60 oder 120 min) erfaßt nur etwa 50 % der grenzwertigen und etwa 75 % der pathologischen Sekretintests.

Zwei Belastungswerte: Nimmt man nur den 30 und 60 min Wert, so erhält man etwa 10 % falsch normale Provokationstests; bei Bestimmung der 60 und 120 min Werte resultieren sogar 13 % falsch normale Tests, wobei hierbei hauptsächlich die grenzwertigen Tests (n = 23) ins Gewicht fallen (pathologische Tests n = 5).

Diese relativ hohen Fehlerquoten liegen mit in der Kinetik des Lipaseaktivitätsanstiegs nach dem Sekretinreiz begründet; denn bei der Durchsicht der Provokationstestverläufe fällt auf, daß sich 2 Typen unterscheiden lassen:

die Lipaseaktivität a) entweder früh ansteigt mit frühem Abfall,

b) später Anstieg nach dem 60 min Wert.

Aus diesem Grund müßten die Analysen nach 30 und 120 min die geringste Fehlerquote aufweisen.

Tab. 12 zeigt, daß dies zutrifft.

Tab.12

Vergleich von Sekretintests bei denen Serumlipasen nur bei 30 und 120 min untersucht wurden mit ungekürzten Sekretintests (einschl. des 60 min Werts)

	Anzahl d. Tests	beide Werte richtig	ein Wert richtig	falsch normal n	%
grenzwertige Tests 155 - 195 U/l	69	11	45	13	23
pathologische Tests über 195 U/l	140	91 a)	45 b)	4	3

a) wovon 23 mal ein Wert grenzwertig

b) wovon 7 mal ein Wert grenzwertig

Bei dieser Kombination der Abnahmezeiten werden von 140 pathologischen Sekretintests nur 4 als falsch normal und 7 als grenzwertig erkannt. Es sind die wenigen Tests, bei denen nur während des 60 min Wertes ein nennenswerter Lipaseaktivitätsanstieg nachweisbar ist.

Bei den 4 falsch normal eingestuften pathologischen Tests erreicht der 60 min Wert höchstens 250 U/l. Ein Test stieg sogar nur um 50 U/l an, während bei pathologischen Sekretintests die Serumlipase durchschnittlich auf das 10 bis 20 fache gegenüber der Aktivität des Nüchternwerts erhöht ist.

Grenzwertige Tests haben für die klinische Beurteilung keinen großen Wert. Häufig ist der Nüchternwert schon im oberen Normalbereich, so daß allein methodisch bedingte Streuungen die Belastungswerte in den Grenzbereich hineinheben. Für diesen Probandenkreis wäre der Grenzbereich zu niedrig angesetzt.

Bei Einsparung des 60 min Sekretinwerts muß man damit rechnen, daß man 3 % der pathologischen Fälle nicht als pathologisch erfaßt.

9. Diagnostische Aussagekraft der Lipase- und Amylaseaktivitätsbestimmung im Serum und Urin bei Pankreopathien.

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich bemüht an Hand einiger Krankheitsverläufe die diagnostische Aussagekraft der Lipase- und Amylaseaktivitätsbestimmung im Serum und Urin bei Pankreaserkrankungen zu beurteilen.

Diese Analyse stützt sich auf die Erfahrungen, die bei den Beobachtungen von 20 Krankheitsverläufen gesammelt wurden, deren pathologisch- anatomisches Korrelat meistens durch Sektionsbefund, Laparoskopie oder Operation gesichert wurde.

Die Lipaseaktivität wurde hauptsächlich mit dem in dieser Arbeit vorgestellten, verbesserten Lipasetest bestimmt. Die Amylaseaktivität wurde überwiegend mit der Methode nach STREET u. CLOSE analysiert.

Um die Empfindlichkeit einer Lipase- oder Amylaseaktivitätserhöhung bei Pankreopathien besser vergleichen zu können, habe ich jeweils das Vielfache des oberen Normalbereichs ($x + 2s$), anstatt die absolute Enzymaktivität in U/l angegeben. Schon vorweg kann gesagt werden, daß keines der beiden Enzyme in jedem Fall als das diagnostisch wertvollste herausgestellt werden kann; vielmehr hat die Amylase wie die Lipase während eines Krankheitsverlaufs zu einem bestimmten Zeitpunkt ihre besondere diagnostische Bedeutung.

Um diese diagnostische Wertung der beiden Enzymbestimmungen zu untermauern, habe ich einige Krankheitsverläufe näher analysiert:

Bei der wohl schwersten Pankreaserkrankung, der akuten Pankreasnekrose, ist die Bestimmung der Lipaseaktivität im Serum diagnostisch am wertvollsten, zumal bei diesem Krankheitsbild meist ein Nierenversagen mit Oligo- oder Anurie auftritt. Abb. 52 und 53 zeigen den höheren Ausschlag der Lipaseaktivität. Zudem war bei einer Patientin (2464/72) mit schwerer hämorrhagischer Pankreasnekrose (durch Sektion verifiziert) nur die Lipaseaktivität initial mit 148 U/l und final mit 233 U/l leicht erhöht, während bei Anurie (Kreatinin 9,9 mg/100 ml) die Serumamylaseaktivität immer im Normalbereich lag.

Auch bei einem anderen Patienten (2824/72) mit frischer nekrotisierender Pankreatitis (Sektionsbefund) war bei Anurie (Kreatinin 13 mg/100 ml) die Serumamylaseaktivität nur auf den zweifachen Wert des Normalbereichs gestiegen, während die Lipaseaktivität den 17fachen Wert des oberen Normalbereichs erreichte.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, sind Cholangiopathien häufig mit einer Begleitpankreatitis verbunden (z.B. Abb. 52). Während die Operationsindikation festgestellt wurde, konnte ich einige Patienten mit Cholangiopathien auf eine begleitende Pankreasaaffektion hin untersuchen. Dabei stelle sich die Urinamylase und die Lipasebestimmung als wichtigste Tests zur Diagnostik einer Pankreasmitbeteiligung heraus. Die Serumamylaseaktivität lag meistens im Normalbereich. Dies trifft aber nur zu, so lange die Pankreasmitbeteiligung klinisch noch nicht in Erscheinung tritt.

Auch der Sekretintest mit Lipaseaktivitätsbestimmung ist zur Erkennung dieser Begleitpankreatitiden und den chronisch rezidivierenden Pankreatitiden im Intervall diagnostisch wertvoll.

Tritt nun diese latente Begleitpankreatitis in Form einer akuten Pankreatitis in Erscheinung, so muß man bei der Auswahl der zur Diagnostik einzusetzenden Enzymbestimmungen zwischen dem Initialstadium und der Verlaufsbeobachtung unterscheiden. Dies trifft auch für alle übrigen akuten Pankreatitiden anderer Ätiopathogenese, zum Beispiel der alkoholischen Pankreatitis, zu.

Bei Beginn einer akuten Pankreatitis erwies sich besonders die Urinamylase und die Lipaseaktivitätsbestimmung als diagnostisch wertvoll, wobei die Urinamylaseaktivität am empfindlichsten reagierte (z.B. Abb. 50 u. 51) (95). Verfolgt man nun den Verlauf dieser akuten Pankreatitis so sieht man, daß diese Urinamylaseaktivitätserhöhung nach einigen Tagen in den Normalbereich abfällt und dort auch während des weiteren Krankheitsverlaufs außer vielleicht kurzzeitiger, diskreter Anstiege verbleibt. So hat sich nach meinen Erfahrungen die Urinamylasebestimmung für die Verlaufsbeurteilung einer akuten

Pankreatitis oder eines erneuten Schubs einer floriden Pankreatitis nicht bewährt (z.B. Abb. 50 u. 52).

Ist nun zur Verlaufsbeurteilung einer akuten Pankreatitis die Lipase- und Amylaseaktivitätsbestimmung im Serum nebeneinander notwendig?

Auf Grund theoretischer Überlegungen, der methodischen Voraussetzungen und der eigenen klinischen Erfahrungen läßt sich zu diesem Problem folgendes sagen:

Die Serumamylaseaktivität verhält sich meist parallel zur Lipaseaktivität. Bedingt durch ihren raschen Wiederabfall in dem Normalbereich ist ihr Verlauf unruhiger, korreliert aber deutlicher mit dem klinischen Bild des Patienten als die Lipaseaktivität. Dies zeigt zum Beispiel Abb. 50 u. 51.

Die Vorteile der Lipaseaktivitätsbestimmung im Serum beruhen erstens auf ihre langdauernde Erhöhung, die den Abfall der Serumamylaseaktivität und erst recht der Urinamylaseaktivität lange überdauern können. Dieses Verhalten der Lipaseaktivität kommt leider in den hier gezeigten Verlaufsbeispielen (Abb. 50 - 53) nicht recht zum Ausdruck.

Zum zweiten zeigt die Lipaseaktivität im Serum am verlässlichsten die Aktualität des Krankheitsgeschehens an. An zwei anderen Patienten mit Pankreatitis (1928/72 u. 2038/72) wie auch in Abb. 51 kann man erkennen, daß eine anhaltend erhöhte Lipaseaktivität unabhängig von ihrem Wert bei normalen Amylaseaktivitäten auf eine noch nicht ausgeheilte Pankreaserkrankung hindeutet. Zumeist ist auch die Lipaseaktivitätserhöhung, ausgedrückt im Vielfachen des Normalbereichs, ausgeprägter als ein gleichzeitiger Serumamylaseanstieg.

Im allgemeinen dürfte es dennoch genügen, nur mit Hilfe der Serumlipaseaktivität den Krankheitsverlauf richtig zu beurteilen; denn normale Lipaseaktivitäten bei erhöhten Serumamylaseaktivitäten konnte ich nur selten beobachten.

Die auf Grund einer Urämie dialysierten Patienten wiesen immer wieder erhöhte Amylase- und Lipaseaktivitäten im Serum auf. Diese Enzymspiegel waren, gemessen vor und nach Dialyse, nur geringen Schwankungen unterworfen. Ebenso variierte die absolute Höhe dieser beiden Enzymspiegel von Tag zu Tag bei

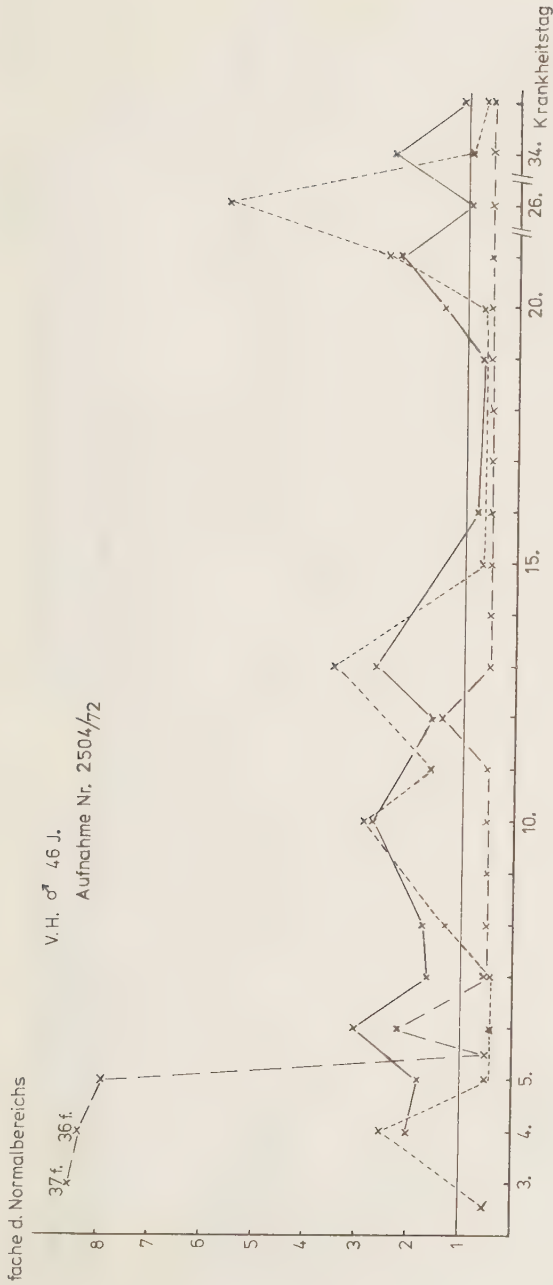


Abb. 50

Schub einer chronischen Pankreatitis

Der Patient wurde schon mehrmals mit rezidivierenden Pankreatitiden stationär aufgenommen (zuletzt vor 7 Monaten); chronische Pankreatitis und geschlossene Lungentuberkulose sind bekannt; Alkoholabusus.

fache d. Normalbereichs



Abb. 51

rezidivierende akute Pankreatitis

histologisch-laparoskopisch: chronische Hepatitis; vor 4 Jahren Operation nach Billroth II; schon zweimal wegen akuter Pankreatitis in klinischer Behandlung (zuletzt 1971).

Alkoholabusus seit 14 Jahren.

Der ambulant durchgeführte Sekretintest am 60. Tag nach stationärer Aufnahme ergab: nüchtern 100 U/l Lipaseaktivität

30 min 133

60 min 137

120 min 126

39. Tag Sekretintest

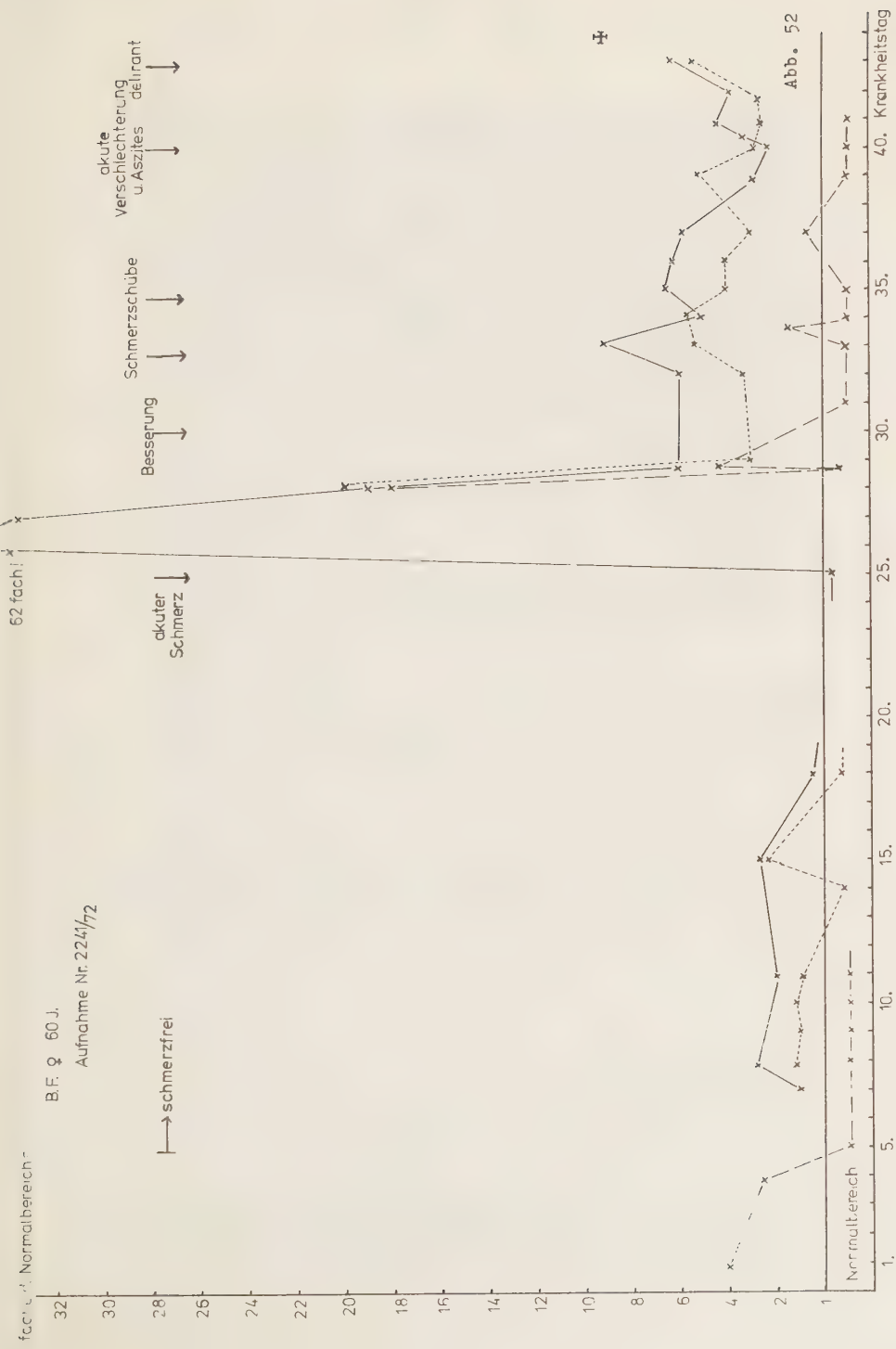
nüchtern 0 mU/ml Lipase

30 min 22

60 11

120 0

Krankheitstag



zu Abb. 52: chronisch rezidivierende Cholezystitis und Cholangitis mit Begleitpankreatitis.

Sektionsbefund: chronisch rezidivierende Cholezystitis und Cholangitis; chronisch rezidivierende, partiell sequestrierte und terminal subtotal nekrotisierte Pankreatitis, nur noch im Caudabereich funktionstüchtiges Pankreasparenchym, sonst nekrotisches, flüssiges Pankreasgewebe;

ausgedehnte Nekrosen des retroperitonealen, mesenterialen und perirenal Fettgewebes;

Lungenödem und Pleuraerguß links;

2800 ml fibrinreicher, hämorrhagischer Aszites gekammert, der einen Bauchtumor vortäuschte;

hydronephrotische Schrumpfniere links;

Schockzeichen: hyaline Thromben, Leberzellennekrose läppchenzentral.

Im Aszites waren Amylase (4580 U/l) und Lipase (3500 U/l) in vivo (40. Krankheitstag) nachweisbar.

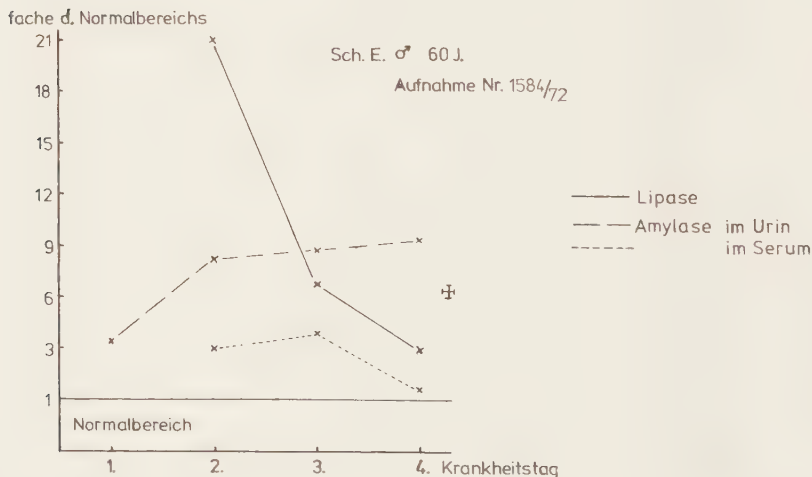


Abb. 53

akute Pankreatitis

Sektionsbefund: feste Pankreasnekrose, nur noch wenige Acini blieben stehen; ausgedehnte Fettgewebsnekrosen im Omentum, in den Mesenterien und im Thorax; ausgedehnte Fettleber.

täglicher Dialyse, so daß man eine Mitbeteiligung des Pankreas bei Urämie annehmen kann.

Schließlich wurden noch zwei Patienten mit unspezifisch erhöhten Lipase- und Amylaseaktivitäten beobachtet:

Bei Duodenalulcus mit Duodenitis (Röntgenbefund) und bei postoperativer Sepsis (Sektionsbefund) konnte einmal klinisch und histologisch eine Pankreasaffektion, die für die Amylase- und Lipaseerhöhung im Serum ursächlich in Frage käme, nicht wahrscheinlich gemacht werden, obwohl bei der akuten, tödlichen Sepsis nach Colezystektomie beide Enzyme auf das vierfache des oberen Normalbereichs angestiegen waren.

Eingedenk der geringen Fallzahl, möchte ich doch zusammenfassend folgende Anregungen zur rationellen Pankreasenzymdiagnostik geben:

Bei der Suche nach klinisch noch unauffälligen Begleitpankreatitiden und zur Erstdiagnostik der akuten Pankreatitis ist die gleichzeitige Bestimmung der Serumlipaseaktivität und der Urinamylaseaktivität am treffsichersten.

Zur Diagnostik dieser Begleitpankreatitiden und der chronisch rezidivierenden Pankreatitiden im Intervall zeigt sich der Sekretintest als besonders wertvolle Untersuchungsmethode, wobei aber nur ein positiver Test diagnostisch gewertet werden darf.

Zur Verlaufsbeobachtung einer Pankreatitis ist die Lipaseaktivitätsbestimmung im Serum im allgemeinen ausreichend. Die Urinamylase bringt keinen zusätzlichen diagnostischen Gewinn, während die Serumamylaseaktivität einzelne Schübe deutlicher markieren kann.

10. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden drei Lipasebestimmungsmethoden - die Methode nach RICK, eine modifizierte quantitative und qualitative Methode - und vier Amylasebestimmungsmethoden - die Methode nach RICK u. STEGBAUER, nach STREET u. CLOSE, der Phadebatest und ein Schnelltest-im Rahmen der Normalwertbestimmung und einiger pathologischer Werte vergleichend untersucht.

Als Inkubationstemperatur wurde 25°C für alle Enzymaktivitätsmessungen gewählt, da unter anderem die Serumlipase schon bei 37°C inaktiviert wird.

An Hand 254 Seren und 150 Morgenurinen wurden unter Mitführung eines Kontrollserums die Normalbereiche der Lipase- und Amylaseaktivitäten ermittelt, wobei der Altersabhängigkeit und der möglichen Verfälschung der Meßwerte durch Antikonzeptivaeinnahme besondere Beachtung geschenkt wurden.

Mit dem verbesserten Lipasetest erhält man viel höhere Ausschläge der Lipaseaktivität als mit der WEBER'schen Methode. Diese höhere Auflösung der Testergebnisse ist, bei geringerer Standardabweichung der Meßergebnisse, besonders im Grenzbereich und bei Verlaufskontrollen von großem diagnostischen Wert.

Mit dem Lipaseschnelltest können Lipaseaktivitäten über 700 U/l schon in wenigen Minuten sicher erkannt werden.

Mit zunehmender Hämoglobinkonzentration im Serum wird die Lipaseaktivität immer mehr gehemmt.

Proben zur Lipaseaktivitätsbestimmung dürfen in den ersten 48 Stunden nach Beginn einer Heparintherapie nicht gewonnen werden.

Die Präzision der Methoden in der Serie und die Qualitätskontrolle von Tag zu Tag wurden mit Hilfe eines Kontrollserums überprüft, wobei auch die Haltbarkeit der Amylase und Lipase im Serum und Urin untersucht wurde.

Der statistische Methodenvergleich wurde unter Berücksichtigung der Meßwerte des Normalkollektivs durchgeführt. Die beiden quantitativen Lipasemethoden übertreffen die Testergebnisse der Amylasemethoden, bezogen auf die methodisch bedingte Streuung der Meßwerte, deutlich an diagnostischer Sicherheit.

Für die Routine werden die Schnelltests als Screeningtests und zur Notfalldiagnostik empfohlen. Als quantitative Methoden haben sich der modifizierte Lipasetest und der jodometrische Amylasetest für die Routinediagnostik bewährt. Für die Vorfelddiagnostik des niedergelassenen Arztes ist die Bestimmung der Urinamylaseaktivität und der Lipaseschnelltest zur Früherkennung einer akuten Pankreatitis ausreichend.

Es wird eine Vereinfachung des Sekretininduzierten Provokationstests mit Messung der Serumlipaseaktivität 30 und 120 min nach Sekretininjektion angegeben.

Bei der Suche nach klinisch noch unauffälligen Begleitpankreatitiden und zur Erstdiagnostik der akuten Pankreatitis ist die gleichzeitige Bestimmung der Serumlipaseaktivität und der Urinamylaseaktivität am treffsichersten.

Zur Diagnostik von Begleitpankreatitiden und der chronisch rezidivierenden Pankreatitiden im Intervall zeigt sich der Sekretintest als besonders wertvolle Untersuchungsmethode, wobei allerdings nur ein positives Testergebnis diagnostisch gewertet werden darf.

Zur Verlaufsbeobachtung einer Pankreatitis ist die Lipaseaktivitätsbestimmung im Serum ausreichend.

11. LITERATURVERZEICHNIS

1. FORELL, M.M.

Funktionsdiagnostik des Pankreas - Bedeutung von Fermentbestimmungen im Urin, Stuhl und Serum - Cholezystokinin-Test
Therapiewoche 1969, 551-553

2. Amylase

The New England Journal of Medicine 277, 982-983, 1967

3. LORENTZ, K.

Vergleich des diagnostischen Wertes der a-Amylasebestimmung im Serum und Urin bei Pankreatitis
Z. Gastroenterologie 8, 39-40, 1970

4. HENRY, J. Richard and CHIAMORI, Neil

Study of the Saccharogenic Method for Determination of Serum und Urine Amylase
Clin. Chem. 6, 434-452, 1960

5. SAX, M. Sylvan; BRIDGWATER, Anna B.; MOORE, John J.

Determination of Serum and Urine Amylase with Use of Procion Brilliant Red M-2BS Amylopectin
Clin. Chem. 17, 311-315, 1971

6. AMBROMOVAGE, Anne M.; M.S.; HOWARD, John M.; M.D.; PAIRENT, Frederick W.; Ph.D.

The Twenty-Four Hour Excretion of Amylase and Lipase in the Urine
Annals of Surgery 167, 539-546, 1968

7. RICK, W.

Kinetischer Test zur Bestimmung der Serumlipaseaktivität
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7, 530-539, 1969

8. WEBER, H.

Mikromethode zur Bestimmung der Pankreaslipase im Serum
Dtsch. med. Wschr. 90, 1170-1174, 1965

9. TONKS, D.B.
An Improved Technic for Blood Glucose by the Folin-Wu-Method
Am. J. Clin. Path. 22, 1009, 1952
10. YANG, Jeun-Sing and BIGGS, H.G.
Rapid, Reliable Method for Measuring Serum Lipase Activity
Clinical Chemistry 17, 512-518, 1971
11. FRITSCH, W.P.; RICK, W.
Verdauungsenzyme in Körperflüssigkeiten
KHA 1971, 418-434
12. Goebell, Harald
Diagnostische Möglichkeiten mit der Bestimmung von Amylase und Lipase in Körperflüssigkeiten
Internist 11, 117-122, 1970
13. WEBER, H. und WEGMANN, T.
Der Nachweis von Pankreopathien durch die Bestimmung der Serumlipase mit Hilfe einer neuen Mikromethode
Dtsch. med. Wschr. 90, 1203-1209, 1965
14. RICK, W.
Der Secretin-Pankreozymin-Test in der Diagnostik der Pankreasinsuffizienz
Internist 11, 110-117, 1970
15. SCHULTIS, K.; WAGNER, E. und VOSSKÖHLER
Die Erfahrungen mit Lipasebestimmungen im Serum für die Diagnostik akuter und chronischer Pankreaserkrankungen
Schweiz. med. Wschr. 99, 602-606, 1969
16. VOSSKÖHLER, Erdmuthe
Zum Nachweis der Fermententgleisung als Kriterium einer Bauchspeicheldrüsenerkrankung durch die Bestimmung der Pankreaslipaseaktivität im Serum
Inaugural-Dissertation, Gießen 1970

17. SOMMER, Hartmut

Der Wert der Serum-Lipase-Bestimmung und der Provokationstests für die Diagnostik von Pankreaserkrankungen

Inaugural-Dissertation, Gießen, 1968

18. DELCOURT, A. und WETTENDORF, P.

La clearance rénale de l'amylase à l'état normal et au cours d'affections pancréatiques.

Kbl. ges. inn. Med. Grenzgeb., 273, 45, 1965

19. SHELDON, W.

Congenital Pancreatic Lipase Deficiency

J. A. M. A. 189, 151, 1964

20. DE MOERLOOSE, P.

Standardization of pancreatic lipase

Chem. Abstr. 56, 14614, 1962

21. DE MOERLOOSE, P.

Aktivität und Wirkung von Gallensalzen auf die Pankreaslipase

Chem. Zbl., 133, 18146, 1962

22. FREEMAN, Monroe E.

Clinical enzyme unitage

Clin. Chem. Acta 6, 300, 1961

23. BURKHARDT, Gerhard; GABSCH, Hans-Christian; LANTSCH, Hubertus

Serumlipasebestimmung im Rahmen der Pankreasdiagnostik

Zschr. inn. Med. 22, 112-115, 1967

24. PAGANONI, O.

Die Serumlipase in der Pankreasdiagnostik

Schweiz. Med. Wschr. 96, 50-53, 1966

25. GÜLZOW, M.

Wert d. Amylasebestimmung i. Serum u. Urin; Lipase, Provokationstest; Pankreopathien u. Intermediärenzyme

Der Internist 5, 88-93, 1964

26. STREBEL, H. M.; EHRENGRUBER, H. und STIRNEMANN, H.
Der diagnostische Wert von Amylasebestimmung und Frühlaparotomie bei einer akuten Pankreatitis
Schweiz. med. Wschr. 100, 1207-1209, 1970
27. KING, E. J.; MOSS, D. W.
International enzyme units and isoenzyme nomenclature.
J. clin. Path. 16, 391-393, 1963
28. HELGER, R.; LANG, H.
Internationale Einheiten bei der Bestimmung der α -Amylase
Ärztl. Lab. 11, 120-123, 1965
29. HEINKEL, K.; TEUFEL, H.
Untersuchungen über die Beziehungen von Pankreassekretion und Blutamylasekonzentration
Ärztl. Lab. 5, 249-269, 1959
30. RITTER, U.
Beziehungen zwischen innerer und äußerer Sekretion des Pankreas
Ärztl. Praxis 19, 2367-2389, 1967
31. ROGE, J.; GOSSET, F.; JAMES, J. M.
Der praktische Arzt und die chronische Pankreatitis
Münch. med. Wschr. 113, 1725-1730, 1971
32. HOWEL; ELMSLIE, R.G.
Abfallende Amylaseaktivität im Serum
Ärztl. Praxis 24, 1337, 1972
33. CESKA, M.; BIRATH, K. and BROWN, B.
A New and Rapid Method for the Clinical Determination of α -Amylase Activities in Human Serum and Urine. Optimal Conditions
Clinica Chimica Acta 26, 437, 1969

34. CESKA, M.; BROWN, B. and BIRATH, K.
Ranges of a-Amylase Activities in Human Serum and Urine and
Correlations with Some Other a-Amylase Methods.
Clinica Chimica Acta 26, 445, 1969
35. STREET, Harold V. and CLOSE, John R.
Determination of Amylase Activity in Biological Fluids
Clinica Chimica Acta 1, 256, 1956
36. CLOSE, J. R. and STREET, H. V.
An Ultra-Micro Method for Determination of Amylase Activity
in Blood Serum.
Clinica Chimica Acta 3, 476, 1958
37. SOMOGYI, Michael
Micromethods for the Estimation of Diastase
J. Biol. Chem. 125, 399, 1938
38. SOMOGYI, Michael
Modifications of Two Methods for the Assay of Amylase
Clin. Chem. 6, 23, 1960
39. WAGNER, E; SCHULTIS, K.; VOSSKÖHLER, E.
Die Abgrenzung der akuten Pankreatitis gegen andere Formen
des akuten Abdomens.
Therapiewoche 19, 1608, 1972
40. PETZOLD, Dieter; MEYER-BURG, Joachim und PALME, Gerhard
Funktionsdiagnostik bei Erkrankungen des exkretorischen
Pankreas
Deutsches Medizinisches Journal 23, 424, 1972
41. MELLIN, H.-E.; STRÖTGES, M. W.
Szintigraphische und klinische Befunde am Pankreas
Dtsch. med. Wschr. 97, 10, 1972
42. HASCHEN, Reinhard J.
Enzymdiagnostik
Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1970

43. HÄRTEL, A.; BANAUCH, D.; HELGER, R.
Ein Suchtest für Lipase im Serum
Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 2, 396-397, 1971
44. RICK, W. und STEGHAUER, H.
Zur Bestimmung der Amylaseaktivität im Harn
Zeitschrift für analytische Chemie 243, 415, 1968
45. SCHIWARA, H.-W.
Ein UV-Test zur Messung der α -Amylase-Aktivität im Serum und
Urin
Z. klin. Chemie u. klin. Biochem. 10, 12-16, 1972
46. FRIED, R. und HOEFLMAYR, J.
Die diagnostische Bedeutung der Lipase und ihre routinemäßige
photometrische Bestimmung.
Therapie der Gegenwart 108, 1788-1798, 1969
47. GRÖZINGER, K.-H.
Ikterus bei Pankreatitis
Therapiewoche 44, 3803, 1972
48. BECKER, V.
Pathologische Anatomie praktisch wichtiger Pankreas-Erkrankungen
dmj 2, 558, 1972
49. NAGEL, M.
Der Verschlussikterus als Komplikation beim Echinokokkus der
Leber
Therapiewoche 44, 3823, 1972
50. Vorträge vom VIII. Weltkongreß für Pathologische Anatomie und
Laboratoriumsmedizin München, September 1972
Selecta 43, 3994, 1972
51. DOMSCHKE, W. H. et al
Funktionsdiagnostik des exokrinen Pankreas
Leber, Magen, Darm 2, 91, 1972

52. MÄRKI, H. H. und BAUMGARTNER, R.
Laboratoriumsdiagnostik bei Pankreaserkrankungen in der Praxis
Therapeutische Umschau 27, 199-202, 1970
53. KAMARYT, J.
Der Einfluß von verschiedenen Substraten auf die α -Amylase-
Heterogenitätsbestimmung
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6, 96, 1968
54. AMMAN, R.
Enzymdiagnostik der Pankreaserkrankungen
Schweiz. med. Wschr. 99, 504, 1969
55. FRASER, G. P. and NICOL, A. D.
Studies on Human Pancreatic Lipase
Clinica Chimica Acta 13, 552, 1966
56. RAJASINGHAM, R; BELL, J. L.; BARON, D. N.
A Comparative Study of the Isoenzymes of Mammalian α -Amylase
Enzyme 12, 180, 1971
57. BERK, J. E.; HAYASHI, S.; SEARCY, R. L. and HIGHTOWER, N. C.
Differentiation of Parotid and Pancreatic Amylase in Human
Serum.
Am. J. Digest. Dis. 11, 695, 1966
58. CLASSEN, Meinhard
3. Kongreß für Gastroenterologische Endoskopie in Stuttgart 1971
59. HOKIN, L. E.; HOKIN, M. R.
The role of phosphatidic acid and phosphoinositide in transmembrane
transport elicited by acetylcholin and other humoral agents.
Int. Rev. Neurobiol. 2, 99, 1960
60. THAL, A.
Studies on pancreatitis
Surgery 37, 911, 1955

61. SPIEGEL, M.
39. Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für
Innere Medizin 1971
62. BLAINEY, J. D.; NORTHAM, B. E.
Amylase Excretion by the Human Kidney
Clin. Sci. 32, 377, 1967
63. PFEFFER, R. B.; DISHMAN, A.; COHEN, T.; TESLER, M.; ARONSON, A.R.
Ausscheidung von Lipase im Urin bei Pankreas- und Leberleiden
Surgery, Gynecol. u. Obstetr., 124, 1071, 1967
64. STAHLHEBER, H.; LEHNERT, P.; FORELL, M. M.
Pankreasdiagnostik in der Praxis
Forum d. prakt. Arztes 2, 7-10, 1972
65. GOEBELL, H.; BODE, Ch.; LEMBERG, G.
Lipase und Amylase im Serum bei Stimulation des normalen und
geschädigten Pankreas mit Sekretin-Pankreozymin
Deutsche Medizin. Wschr. 94, 2086-2097, 1969
66. SCHMIDT, Helmut
Möglichkeiten und Grenzen moderner Pankreas-Diagnostik
Ärztl. Fortbildung 17, 273-280, 1969
67. SCHMIDT, Helmut
Pankreasenzymdiagnostik in Serum, Harn und Exsudaten
Ärztl. Lab. 13, 155-162, 1967
68. MULHAUSEN, R.; BROWN, D. C.; ONSTAD, G.
Renal Clearance of Amylase During Pancreatitis
Metabolism, 8, 669-674, 1969
69. WOHLGEMUTH, J.
Über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des
diastatischen Ferments
Biochem. Wschr. 2, 1-9, 1908

70. TIETZ, N. W.; FIERECK, E. A.
A specific Method for Serum Lipase Determination
Clinica Chimica Acta 13, 352-358, 1966
71. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie
Z. klin. Chemie u. klin. Biochem. 8, 658-660, 1970
72. SHIHABI, Z. K.; BISHOP, Ch.
Simplified Turbidimetric Assay for Lipase Activity
Clinical Chemistry 17, 1150-1153, 1971
73. BERGMAYER, H. U.
Standardization of the Reaction Temperature for the Determination of Enzyme Activity
Z. Klin. Chem. Biochem. 11, 39-45, 1973
74. HOLLMANN, M.
Heparin, Lipoproteinlipase und Plasmalipide
Deutsches Medizinisches Journal 19, 270-278, 1968
75. OEHLER, G.
persönliche Mitteilung
76. RICK, W.; STEGBAUER, H. P.
In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Auflage Weinheim:
Chemie 1970, Band 1, S. 848-853
77. LORENTZ, K.; OLTMANNS, D.
Eine neue saccharogene Amylasebestimmung
Med. Labor 23, 25, 1970
78. BABSON, A. L.; TENNEY, S. A.; MEGRAW, R. E.
New Amylase Substrate and Assay Procedure
Clin. Chem. 16, 39-43, 1970

79. DALAL, F. R.; WINSTEIN, S.
Laboratory Evaluation of a Chromogenic Amylase Method
Clin. Chim. Acta 32, 327-332, 1971
80. KLEIN, B.; FOREMAN, J. A.; SEARCY, R. L.
New Chromogenic Substrate for Determination of Serum Amylase Activity
Clin. Chem. 16, 32-38, 1970
81. RINDERKNECHT, H.; MARBACH, E. P.
A NEW Automated Method for the Determination of Serum α -Amylase
Clin. Chim. Acta, 29, 107-110, 1970
82. HALL, F.; CULP, T. W.; HAYAKAWA, T.; RATLIFF C. R. and HIGHTOWER, N. C.
An Improved Amylase Assay Using a New Starch Derivative
Amer. J. clin. Path. 53, 627-634, 1970
83. CHUNG, K. Y.; SINHA, R. M. and TREW, J. A.
Comparison of Two Methods for Determining Amylase Activity in Serum and Urin
Clinical Chemistry 17, 89-91, 1971
84. WERNER, R. und KEILICH, G.
Eine enzymatische Methode zur kinetischen Untersuchung von Endohydrolasen: Aktivitätsbestimmung von α -Amylase
Biochemische Zeitschrift 342, 226-235, 1965
85. KEILICH, G. und WERNER, R.
Aktivitätstest für Polysaccharidphosphorylase aus Kartoffeln
Biochemische Zeitschrift 342, 217-225, 1965
86. RICK, W.
persönliche Mitteilungen
87. SCHLAEGER, R. und KATTERMANN, R.
Arylamidase und ihre Isoenzyme bei Erkrankungen des Pankreas und der Leber
Clin. chim. Acta 33, 13, 1971

88. FRIED, R. und HOEFLMAYR, J.
Die Bestimmung der Lipaseaktivität unter Verwendung von
Olivenöl als Substrat in neuer Form
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 189-192, 1973
89. VEIBRI, S. et al.
Immunologische Mechanismen bei Pankreaserkrankungen
Med. Klin. 68, 10, 1973
90. DINGJAN, P. G.; JONGENEEL, J.; POSTMA, T. and STROES, J. A. P.
Evaluation of the Determination of Alanine Naphthyl-Amidase
Isoenzymes by Agar and Polyacrylamide Disc Elektrophoresis
for the Diagnosis of Pancreatic Diseases
Clin. chim. Acta 49, 215-224, 1973
91. MARUHN, D. und PAAR, D.
Bestimmung der α -Amylase mit Reacton Rot 2 B Amylopectin
Ärztl. Lab. 12, 371-379, 1973
92. Mitteilung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9, 464-465, 1971
93. BAYINDIR, S.; FASSBENDER, C. W.
Die Bedeutung der selektiven Angiographie von A. coeliaca und
A. mesenterica sup. für die Diagnostik von chirurgischen
Oberbaucherkrankungen
Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen in der Nuk-
learmedizin; Heft 1, 1967
94. SCHMIDT, H.; SCHLAEGER, R.
Amylase und Lipase in Serum und Urin
Med. Klin. 52, 1717-1722, 1972
95. GAMBILL, Earl E. and MANSON, Harold L.
One-Hour Value for Urinary Amylase in 96 Patients with
Pancreatitis
JAMA 186, 130-134, 1963

96. GOEBELL, H.; BODE, Ch. und LEMBERG, G.
Lipase und Amylase im Serum bei Stimulation des normalen und
geschädigten Pankreas mit Sekretin-Pankreozymin
DMW 94, 2088-2097, 1969
97. STAMM, D.
Spezifität von Analysenmethoden Seite 187 f.
In: Optimierung der Diagnostik; Herausgeber Lang, H.;
Rick, W. und Róka, L.
Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie, Merck-Symposium 1973
98. DIMAGNO, E. P. and SUMMERSKIL, W. H. J.
Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption
in severe pancreatic insufficiency.
New England J. Med. 288, 813-815, 1973

12. Tabellen

Erläuterung der Abkürzungen der Varianzanalyse:

Varianz	bei signifikanten F - Werten
1. = Zwischen BM und BQ	ungleicher Ordinatenabschnitt
2. = Abweichungen der Mittelwerte um ihre Regressionsgerade	Mittelwerte nicht auf Regressionsgerade
3. = Zwischen BQ und B (J)	Geraden verlaufen nicht parallel
4. = Abweichungen um die individuelle Regressionsgerade	
5. = Globale Regression	allgemeine Abhängigkeit
6. = Abweichungen um die gemeinsame Regressionsgerade	
7. = Summe	
SAQ = Summe der Abweichungssquadrate	
FG = Freiheitsgrade	
MAQ = mittleres Abweichungsquadrat	

12.1. VARIANZANALYSEN der ALTERSABHÄNGIGKEIT

Wenn nichts abweichendes vermerkt ist, sind nicht transformierte Werte angegeben; x = Alter in Monaten

12.1.1. Lipase - RICK (U/1)

Gruppe der männlichen Probanden:

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
Regression	13906,86	1	13906,86	12,12
Rest	134270,98	117	1147,61	
Gesamt	148177,84	118		

Regressionsgerade $y = 24,939 + 0,0563 \cdot x$

Varianzanalysen aller Altersklassen

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	1157,16	1	1157,16	0,975
2.	638,04	1	638,04	0,537
3.	4496,96	2	2248,48	1,895
4.	294264,12	248	1186,54	
5.	11207,01	1	11207,01	9,396
6.	300556,30	252	1192,68	
7.	311763,32	253		

12.1.2. Lipase modifiziert (U/l)

Gruppe der männlichen Probanden:

Varianz:	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
Regression	12251,09	1	12251,09	12,61
Rest	113591,53	117	970,86	
Gesamt	125842,63	118		

Regressionsgerade $y = 28,833 + 0,0529 \cdot x$

Varianzanalyse aller Altersklassen

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	30,59	1	30,59	0,0302
2.	142,95	1	142,95	0,1410
3.	3779,22	2	1889,61	1,8631
4.	251522,25	248	1014,20	
5.	12021,60	1	12021,60	11,8581
6.	255475,03	252	1013,78	
7.	267496,61			

12.1.3. Amylase im Serum - RICK u. STEGBAUER (U/l)

Varianzanalyse aller Altersklassen

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	11752,61	1	11752,61	1,3605
3.	59,88	1	59,88	0,0069
4.	2159593,25	250	8638,37	
5.	25564,12	1	25564,12	2,9668
6.	2171405,75	252	8616,68	
7.	2196969,87	253		

(log-transformierte Werte)

1.	0,0743	1	0,0743	0,9986
2.	0,0111	1	0,0111	0,1487
3.	0,0082	2	0,0041	0,0552
4.	18,4471	248	0,0744	
5.	0,3487	1	0,3487	4,7388
6.	18,5407	252	0,0736	
7.	18,8893	253		

12.1.4. Amylase im Serum - STREET u. CLOSE (SCE)

Gruppe der weiblichen Probanden:

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
Regression	20,097	1	20,097	4,4462
Rest	601,179	133	4,5201	
Gesamt	621,276	134		

Regressionsgerade $y = 7,8733 + 0,0020 \cdot x$

Varianzanalyse aller Altersklassen

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	20,45	1	20,45	4,4315
3.	0,21	1	0,21	0,0457
4.	1154,15	250	4,61	
5.	32,02	1	32,02	6,8682
6.	1174,82	252	4,66	
7.	1206,84	253		

12.1.5. Amylase im Serum - Phadebas (Ext.)

Gruppe der männlichen Probanden:

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
Regression	0,0117	1	0,0117	4,7207
Rest	0,2906	117	0,0025	
Gesamt	0,3024	118		

Regressionsgerade $y = 0,1707 + 0,0001 \cdot x$

Varianzanalyse aller Altersklassen

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	0,0007	1	0,0007	0,3036
3.	0,0018	1	0,0018	0,8249
4.	0,5541	250	0,0022	
5.	0,0127	1	0,0127	5,7615
6.	0,5566	252	0,0022	
7.	0,5694	253		

12.1.6. Amylase im Urin - RICK u. STEGBAUER (U/l)

Gruppe der männlichen Probanden:

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
Regression	292537	1	292537	4,2009
Rest	5153113	74	69636	
Gesamt	5445650	75		

Regressionsgerade $y = 544,77 - 0,2204 \cdot x$

Gruppe der weiblichen Probanden:

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
Regression	396927	1	396927	5,0374
Rest	6146056	72	78795	
Gesamt	6542983	73		

Regressionsgerade $y = 529,76 - 0,2735 \cdot x$

Varianzanalyse aller Altersklassen

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	55164,8	1	55164,8	0,7421
3.	7954,3	1	7954,3	0,1070
4.	11299170	146	74336,6	
5.	686298	1	686298	9,3018
6.	11362289	148	73781	
7.	12048588			

(log-transformierte Werte)

1.	0,5851	1	0,5851	7,0908
3.	0,0182	1	0,0182	0,2208
4.	12,0478	146	0,0825	
5.	0,7103	1	0,7103	8,3094
6.	12,6511	148	0,0855	
7.	13,3614	149		

12.1.7. Amylase im Urin - STREET u. CLOSE (SCE)

Gruppe der männlichen Probanden:

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
Regression	303,2	1	303,2	5,3212
Rest	4216,6	74	56,9	
Gesamt	4519,8	75		

Regressionsgerade $y = 17,85 - 0,0071 \cdot x$

Gruppe der weiblichen Probanden:

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
Regression	290,2	1	290,2	4,2251
Rest	5358,9	72	68,7	
Gesamt	5649,2	73		

Regressionsgerade $y = 16,83 - 0,0074 \cdot x$

Varianzanalysen aller Altersklassen

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	51,48	1	51,48	0,8172
3.	0,25	1	0,25	0,0040
4.	9575,60	146	62,99	
5.	597,55	1	597,55	9,5585
6.	9627,34	148	62,51	
7.	10224,89	149		

(log-transformierte Werte)

1.	0,3573	1	0,3573	6,9518
3.	0,0027	1	0,0027	0,0520
4.	7,5031	146	0,0514	
5.	0,4332	1	0,4332	8,1542
6.	7,8631	148	0,0531	
7.	8,2963	149		

12.1.8. Amylase im Urin - Phadebas (Ext.)

Gruppe der weiblichen Probanden

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
Regression	0,0535	1	0,0535	4,3120
Rest	0,9681	72	0,0124	
Gesamt	1,0217	73		

Regressionsgerade $y = 0,2033 - 0,0001 \cdot x$

Varianzanalyse aller Altersklassen

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	0,0032	1	0,0032	0,2798
3.	0,0015	1	0,0015	0,1330
4.	1,7309	146	0,0114	
5.	0,0884	1	0,0884	7,8409
6.	1,7356	148	0,0113	
7.	1,8240	149		

(log-transformierte Werte)

1.	0,3339	1	0,3339	4,8903
3.	0,0014	1	0,0014	0,0203
4.	9,9681	146	0,0683	
5.	0,4740	1	0,4740	6,8088
6.	10,3034	148	0,0696	
7.	10,7774	149		

12.1.9. Harnstoffkonzentration im Urin (mg/100 ml)

Varianzanalyse aller Altersklassen

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	27639,6	1	27639,6	0,039
3.	1585889,5	1	1585889,5	2,240
4.	***	146	708021,9	
5.	***	1	***	19,283
6.	***	148	709356,2	

12.2. VARIAZANALYSEN der KORRELATIONEN

Diese Korrelationen wurden aus den nicht transformierten Meß-
ergebnissen des Normalkollektivs berechnet.

12.2.1. Serumamylase RICK u. STEGBAUER (U/l) - STREET u. CLOSE (SCE)

Varianz	SAQ	PG	MAQ	F - Wert
1.	15,33	1	15,33	9,218
2.	1,908	5	0,381	0,229
3.	11,73	6	1,956	1,17
4.	399,20	240	1,663	
5.	778,65	1	778,65	458,25
6.	428,18	252	1,699	
7.	1206,83	253		

Serumamylase nach RICK u. STEGBAUER (U/l) - STREET u. CLOSE (Ext.)

1.	0,015	1	0,015	5,529
2.	0,007	5	0,001	0,559
3.	0,023	6	0,004	1,430
4.	0,668	240	0,002	
5.	1,141	1	1,141	401,79
6.	0,716	252	0,002	
7.	1,857	253		

12.2.2. Serumamylase RICK u. STEGBAUER (U/l) - PHADEBAS UM 8304 (E)

1.	0,001	1	0,001	1,184
2.	0,005	5	0,001	1,219
3.	0,005	6	0,000	0,880
4.	0,225	240	0,000	
5.	0,332	1	0,332	353,02
6.	0,237	252	0,000	
7.	0,596	253		

12.2.3. Serumamylase STREET u. CLOSE (SCE) - PHADEBAS UM 8304 (E)

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	0,000	1	0,000	0,009
2.	0,007	5	0,001	1,117
3.	0,014	6	0,002	1,889
4.	0,306	240	0,001	
5.	0,241	1	0,241	185,27
6.	0,328	252	0,001	
7.	0,569	253		

Serumamylase STREET u. CLOSE (Ext.) - PHADEBAS UM 8304 (Ext.)

1.	0,026	1	0,026	6,123
2.				
3.	0,003	1	0,003	0,754
4.	1,085	250	0,004	
5.	0,742	1	0,742	167,79
6.	1,115	252	0,004	
7.	1,857	253		

12.2.4. STREET u. CLOSE (Ext.) - STREET u. CLOSE (SCE)

1.	0,000	1	0,000	1,668
2.				
3.	0,000	1	0,000	1,141
4.	0,051	250	0,000	
5.	1,805	1	1,805	8755,05
6.	0,052	252	0,000	
7.	1,857	253		

12.2.5. Serumlipase RICK (U/l) - modifizierte Methode (U/l)

1.	100,76	1	100,76	0,953
2.	1063,60	5	212,72	2,013
3.	645,73	6	107,62	1,018
4.	25350,66	240	105,62	
5.	240335,86	1	240335,86	2229,85
6.	27160,77	252	107,78	
7.	267496,64	253		

12.2.6. Urinamylase RICK u. STEGBAUER (U/l) - STREET u. CLOSE (SCE)

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	1,831	1	1,831	0,320
2.	11,25	4	2,814	0,492
3.	15,52	5	3,104	0,543
4.	788,97	138	5,717	
5.	6480,37	1	6480,37	1173,07
6.	817,58	148	5,524	
7.	7297,96	149		

Urinamylase RICK u. STEGBAUER (U/l) - STREET u. CLOSE (Ext.)

1.	3,462	1	3,462	0,080
2.	35,84	4	8,962	0,208
3.	257,78	5	51,55	1,197
4.	5939,43	138	43,039	
5.	28602,81	1	28602,81	678,77
6.	6236,52	148	42,13	
7.	34839,34	149		

12.2.7. Urinamylase RICK u. STEGBAUER (U/l) - PHADEBAS VL 1611 (E)

1.	70,13	1	70,13	0,057
2.	1135,83	4	283,95	0,233
3.	10080,61	5	2016,12	1,654
4.	168185,78	138	1218,73	
5.	1072732,59	1	1072732,59	884,61
6.	179472,37	148	1212,65	
7.	1252204,96	149		

12.2.8. Urinamylase STREET u. CLOSE (SCE) - PHADEBAS VL 1611 (E)

1.	61,24	1	61,24	0,034
2.	1301,57	4	325,39	0,183
3.	15251,73	5	3050,34	1,717
4.	245160,75	138	1776,52	
5.	990429,65	1	990429,65	559,95
6.	261775,30	148	1768,75	
7.	1252204,96	149		

Urinamylase STREET u. CLOSE (Ext.) - PHADEBAS VL 1611 (E)

Varianz	SAQ	FG	MAQ	F - Wert
1.	2020,60	1	2020,60	0,795
2.	892,30	4	223,07	0,088
3.	10886,16	5	2177,23	0,859
4.	349661,46	138	2533,77	
5.	888744,43	1	888744,43	361,89
6.	363460,53	148	2455,81	
7.	1252204,96	149		

12.2.9. Urinamylase STREET u. CLOSE (SCE) - STREET u. CLOSE (Ext.)

1.	3,745	1	3,745	0,303
2.	1,686	4	0,421	0,034
3.	78,680	5	15,73	1,275
4.	1702,14	138	12,33	
5.	33053,08	1	33053,08	2738,60
6.	1786,25	148	12,06	
7.	34839,34	149		

12.2.10. Harnstoff (mg/100 ml) - Kreatinin (mg/100 ml) im Morgenurin

1.	8612,97	1	8612,97	4,438
2.	63644,48	4	15911,12	8,199
3.	5897,08	5	1179,41	0,607
4.	267806,82	138	1940,62	
5.	251452,07	1	251452,07	107,56
6.	345961,36	148	2337,57	
7.	597413,43	149		

Herrn Prof. Dr. L. Róka danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die mir stets gewährte Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenfalls danke ich besonders Herrn Wilfried Höbel vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Gießen, der mir mit Rat und freundlicher Unterstützung bei statistischen Problemen stets helfend zur Seite stand.

Lebenslauf

Am 27. Mai 1948 wurde ich als Sohn des Studenten der Medizin Karl-Heinz Löckermann und seiner Frau Erika geb. Wessing in Frankfurt am Main geboren. Meine ersten Lebensjahre verbrachte ich in Frankfurt/Höchst und besuchte dort drei Jahre lang die Volksschule. Nach dem Umzug nach Hamburg 1957 beendete ich dort die vierte Volksschulklasse und trat anschließend in das neusprachliche Gymnasium Brecht ein. 1961 zogen wir abermals um und zwar nach Darmstadt. Dort besuchte ich das neusprachliche Justus-Liebig-Gymnasium, an dem ich am 19. Juni 1968 das Abitur bestand. Zum Wintersemester 1968 immatrikulierte ich mich an der medizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen, an der ich 1971 die ärztliche Vorprüfung und am 9. Juli 1974 die ärztliche Prüfung ablegte. Seit dem 1. September 1974 bin ich Medizinalassistent am Zentrum für Innere Medizin der Justus Liebig-Universität.

